



UNIVERSITÀ DI PISA  
Dipartimento di Farmacia

---

Corso di Laurea Specialistica in FARMACIA

Tesi di Laurea

**SINTESI DI POTENZIALI FARMACI PER IL TRATTAMENTO  
DELLA PATOLOGIA DELL'ALZHEIMER ATTRAVERSO LA  
COMBINAZIONE DELLA TACRINA E ANTIOSSIDANTI**

Relatori:

Dott.ssa Simona Rapposelli

Dott.ssa Maria Digiacomo

Candidata:

Benedetta Bagnoli

---

Anno Accademico 2012/2013 – Sessione di Laurea 6 Marzo 2014

# Indice

<b>Introduzione generale</b>	3
1. La malattia di Alzheimer (AD)	4
1.1 Aspetti molecolari della malattia	5
1.1.1 Placche senili	5
1.1.2 Aggregati neurofibrillari (NFTs)	6
1.1.3 APOE	7
1.1.4 Ioni metallo e AD	7
1.1.5 Ione $\text{Ca}^{2+}$ e AD	9
1.1.6 Stress ossidativo	9
1.1.7 La cascata colinergica	11
2. La terapia attuale di AD	14
2.1 Gli inibitori di AChE	14
2.2 Antagonisti NMDA	15
3. Potenziali strategie terapeutiche in AD: il multi target	16
3.1 Antiossidanti multifunzionali	16
3.2 Gli inibitori dell'AChE e i bloccanti del canale calcio	21
3.3 Inibitori AChE e NMDAR	22
3.4 Antiossidanti e antinfiammatori	23
3.5 Inibitori multitarget di chinasi	24
3.6 Chelanti multitarget dei metalli	25
3.7 Ibridi multifunzionali di tacrina	27
3.8 Inibitori duali AChE-MAO	28
4. Conclusioni e sviluppi futuri	30
<b>Introduzione alla parte sperimentale</b>	31
<b>Parte sperimentale</b>	42
<b>Bibliografia</b>	56

# **Introduzione generale**



## 1. La malattia di Alzheimer (AD)

La patologia dell'Alzheimer (Alzheimer's disease, AD) è principalmente caratterizzata da una forte degenerazione del sistema nervoso centrale (SNC). Rappresenta la forma di demenza più comune negli anziani. E' una malattia irreversibile, in cui si verifica una perdita progressiva delle facoltà intellettive a cui segue la perdita della propria autonomia nelle attività della vita quotidiana.

AD è stata descritta per la prima volta dal neuropatologo Alois Alzheimer durante la *Convenzione Psichiatrica di Tübingen*, nella quale presentò il caso di una donna di 51 anni affetta da una forma sconosciuta di demenza. Osservando sezioni del cervello della paziente deceduta, notò la presenza diffusa di due tipi di alterazioni che oggi vengono denominate "placche senili" e ammassi neurofibrillari (*neurofibrillary tangles*).

La malattia può essere suddivisa in tre fasi principali:

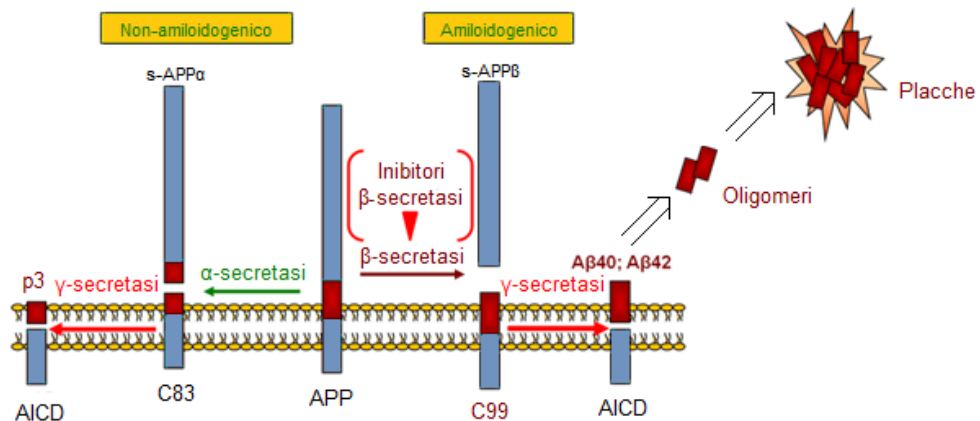
- *una fase iniziale*, in cui si manifesta la perdita della memoria con comparsa di disorientamento spazio-temporale e dissoluzione progressiva del linguaggio;
- *una fase intermedia*, in cui il danno della memoria si accentua e si accompagna a deficit di comprensione e utilizzo di parole sbagliate;
- *una fase tardiva*, in cui il paziente diventa incapace di sostenere una vita di relazione; possono comparire sintomi di tipo psicotico e comportamenti inappropriati e alterazioni motorie a cui segue la perdita dell'autonomia.

L'evoluzione della patologia è estremamente variabile, soprattutto per quanto riguarda la comparsa dei sintomi e la velocità di progressione della malattia stessa. Le cause di questa affezione non sono ancora note e si ritiene che, nella maggior parte dei casi, sia dovuta ad una variegata serie di fattori ambientali e componenti genetiche.

## 1.1 Aspetti molecolari della malattia

### 1.1.1. Placche senili

Una delle caratteristiche di AD è la formazione delle cosiddette *placche senili* costituite da depositi di fibrille amiloidi a carico del SNC. Questi depositi di amiloide sono costituiti da un peptide di 4-kDa con una struttura beta, chiamata beta-amiloide ( $A\beta$ ).  $A\beta$  deriva dalla proteolisi della proteina precursore dell'amiloide (APP), inizialmente ad opera della  $\beta$ -secretasi (BACE) e in seguito della  $\gamma$ -secretasi (GS) che porta alla produzione del peptide  $A\beta_{1-40}$  o della variante  $A\beta_{1-42}$  (Fig. 1). Questi peptidi  $A\beta$  non hanno le caratteristiche biologiche della forma naturale e tendono a depositarsi in aggregati extracellulari sulla membrana dei neuroni. La lunghezza dei peptidi  $A\beta$  è di fondamentale importanza, sembra che  $A\beta_{1-42}$  abbia un potenziale neurotossico superiore al più abbondante peptide  $A\beta_{1-40}$ . Effettivamente  $A\beta_{42}$  è il principale peptide trovato nelle placche neuritiche e nei diffusi depositi di amiloide [1]. Il processo di aggregazione di  $A\beta$  inizia con la formazione di monomeri e procede con dimeri, oligomeri solubili, protofibrille e infine fibrille. Queste evidenze sperimentali hanno portato alla ricerca di una classe di farmaci che hanno come target le  $\gamma$ -secretasi, concentrandosi quindi sulla limitazione della produzione totale del peptide  $A\beta$  attraverso l'inibizione diretta dell'attività della  $\gamma$ -secretasi.



**Figura 1:** Formazione di placche senili a partire da APP

### 1.1.2 Aggregati neurofibrillari (NFTs)

Un ulteriore meccanismo patologico di AD è caratterizzato dalla formazione di aggregati neurofibrillari (NFTs), che sono strutture istopatologiche localizzate all'interno delle cellule neuronali. Gli NFTs, o grovigli neurofibrillari, sono aggregati intracellulari di una proteina filamentosa a doppia elica iperfosforilata, la proteina *tau*. *Tau* è una proteina multifunzionale che svolge un ruolo importante nel montaggio e nella stabilizzazione dei microtubuli. In condizioni normali, l'equilibrio tra fosforilazione e defosforilazione di *tau* modula la stabilità del citoscheletro. In AD varie proteine chinasi e fosfatasi iperfosforilano la proteina *tau*, determinando un cambiamento strutturale e conformazionale che impedisce il suo legame con la tubulina e quindi l'assemblaggio dei microtubuli. In particolare la proteina chinasi GSK3 è implicata nella fosforilazione di *tau* e svolge un ruolo importante nella patogenesi dell'AD.

### 1.1.3 APOE

Recentemente un gene che codifica per una proteina coinvolta nel trasporto del colesterolo (ApoE) è stato identificato come associabile al morbo di Alzheimer.

Sebbene i meccanismi che evidenziano la natura patogena di APOE nell'AD non siano stati ancora completamente chiariti, recenti prove sperimentali indicano che APOE può contribuire alla patogenesi dell'AD sia tramite meccanismi  $A\beta$ -dipendenti che  $A\beta$ -indipendenti [2]. Su questa base attualmente sono in via di sviluppo numerose strategie terapeutiche rivolte a ridurre o limitare l'attività di APOE, attraverso la regolazione dell'espressione genica o tramite lo sviluppo di molecole capaci di impedire l'interazione di APOE con  $A\beta$ .

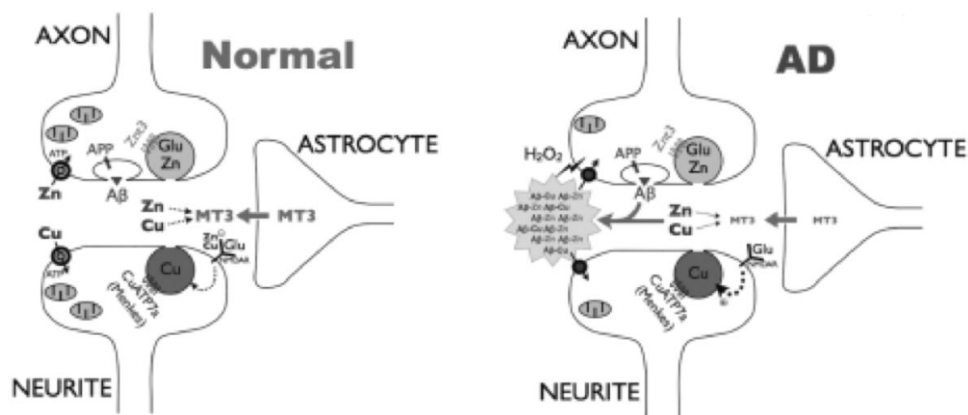
### 1.1.4 Ioni metallo e AD

Oltre all'ipotesi della cascata amiloide, che afferma che un equilibrio alterato tra la produzione di  $A\beta$  e la clearance sia la causa principale di AD, sussistono evidenze convincenti circa il ruolo dannoso nella patogenesi di AD svolto anche dagli squilibri degli ioni metallici, in particolare Zn, Cu, e Fe [3].

Di conseguenza, mentre l'ipotesi della cascata amiloide favorisce trattamenti che inibiscono la produzione di  $A\beta$  o migliorano la clearance di  $A\beta$  nel cervello con AD [4], l'ipotesi degli ioni metallici favorisce trattamenti con i chelanti che affrontano gli squilibri degli ioni metallici, i quali presumibilmente causano l'accumulo di amiloide e lo stress ossidativo. I principali ioni metallici che hanno un ruolo chiave nella regolazione della funzione sinaptica sono il Cu e lo Zn.

Lo zinco è rilasciato insieme al neurotrasmettitore glutammato dal nervo sinaptico glutamatergico nello spazio sinaptico dopo l'attivazione neuronale e quindi interagisce con diversi recettori, canali ionici e trasportatori. Mentre il glutammato stimola il recettore NMDA, lo Zn lo

inibisce, delineando un effetto modulatorio sulla trasmissione glutamatergica [5]. Al contrario, il Cu viene rilasciato dal lato post sinaptico del vallo dopo l'attivazione NMDA. Anche questo ione metallico svolge un ruolo nella regolazione della funzione sinaptica (Fig. 2) [6]. Mentre il pool di zinco è stato segnalato essere anormalmente elevato nel sangue e nell'ippocampo di pazienti con AD, i suoi livelli sembrano essere minori nel liquido cerebrospinale dei malati di Alzheimer.



**Figura 2:** Ruolo di Cu e Zn nella regolazione della funzione sinaptica in condizioni normali e patologiche

I peptidi Aβ, una volta aggregati tra loro, tendono a reagire con i metalli di transizione, come lo zinco e il rame, i quali inducono una rapida precipitazione di Aβ: infatti, analisi su cervelli affetti da AD hanno rivelato Cu e Zn accumulati in placche amiloidi extracellulari. Il sequestro di Cu da parte di Aβ porta alla generazione di specie reattive dell'ossigeno mentre quello dello Zn priva i neuroni e le sinapsi di uno ione metallico la cui omeostasi sinaptica è essenziale per la corretta funzione cerebrale. Considerando che le interazioni tra Aβ e gli ioni metallici contribuiscono alla tossicità e alla deposizione di Aβ nel cervello affetto da AD, i composti chelanti dei metalli dovrebbero prevenire questa interazione e quindi avere un'azione protettiva.



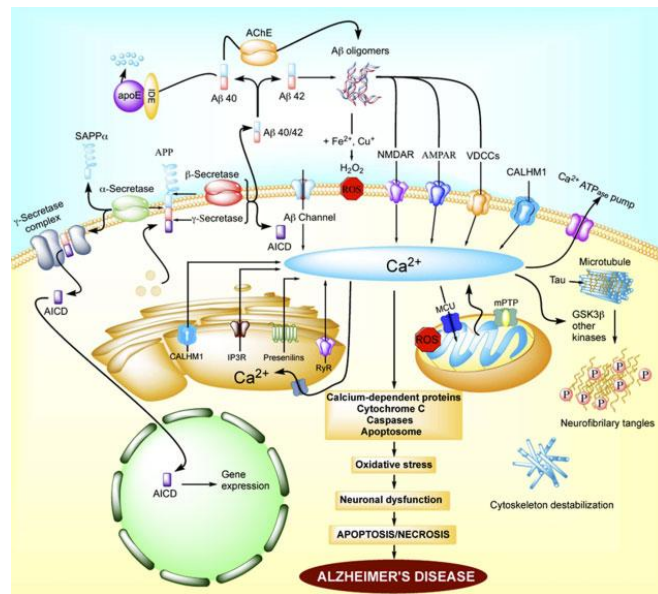
### 1.1.5 Ione $\text{Ca}^{2+}$ e AD

Tra i fattori che svolgono un ruolo significativo nella fisiopatologia dell'Alzheimer, è da riportare anche lo ione calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) che è uno dei più importanti secondi messaggeri nel cervello: infatti l'equilibrio degli ioni metallici è fondamentale per molte funzioni fisiologiche, in particolare nel SNC in cui gli ioni come il  $\text{Ca}^{2+}$  sono essenziali per il mantenimento delle attività enzimatiche, della neurotrasmissione, dell'apprendimento e della memoria. Nell'AD lo squilibrio di  $\text{Ca}^{2+}$  rischia essere una delle principali cause di neurodegenerazione [7, 8].

L'elevata concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  può anche influenzare l'interazione della proteina *tau* con la tubulina: in effetti il  $\text{Ca}^{2+}$  può modificare l'attività della glicogeno sintasi chinasi  $3\beta$  (GSK3 $\beta$ ) e di altre chinasi inducendo una iperfosforilazione di *tau* per generare, dopo la sua aggregazione, i grovigli neurofibrillari.

### 1.1.6 Stress ossidativo

$\text{A}\beta$  ha la capacità di influenzare i mitocondri inducendo stress ossidativo e disregolazione di  $\text{Ca}^{2+}$ . Ciò comporta un aumento della produzione di radicali liberi (ROS) e una diminuita produzione di ATP. Alte concentrazioni di  $\text{Ca}^{2+}$  possono essere immagazzinate dai mitocondri attraverso il canale mitocondriale  $\text{Ca}^{2+}$  uniporter (MCU), con conseguente sovraccarico nei mitocondri di ioni calcio, apertura del poro di permeabilità e transizione mitocondriale (mtPTP) e infine apoptosi (Fig. 3).



**Figura 3:** Pathways interconnessi in AD

Studi approfonditi dei meccanismi che portano alla neurodegenerazione portano a concludere che alcuni di questi, come la disfunzione dei mitocondri, l'infiammazione, lo squilibrio di calcio, il misfolding delle proteine e lo squilibrio dei metalli coesistono e interferiscono tra loro a più livelli (Fig. 4).



**Figura 4:** Carattere multifattoriale di AD

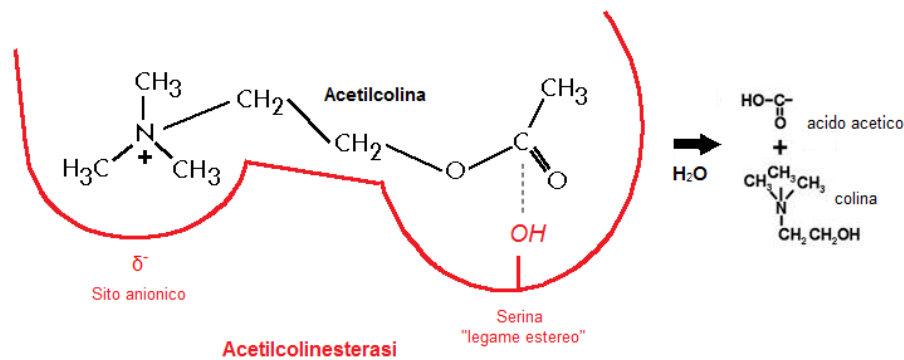
Un altro fenomeno che porta ad un'aumentata produzione di radicali liberi e ad una tossicità neuronale è la cosiddetta *eccitossicità*, ossia la tossicità esercitata dai neurotrasmettitori eccitatori come il glutammato e l'aspartato. Il glutammato è il principale neurotrasmettitore eccitatorio del cervello dei mammiferi e, una volta rilasciato dal neurone, può attivare diversi tipi di recettori tra i quali il recettore N-metil-D-aspartato (NMDAR) che è permeabile al  $\text{Ca}^{2+}$ . L'attivazione del NMDAR provoca quindi un afflusso di calcio extracellulare: il conseguente aumento dei livelli di  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmatico che ne risulta porta ad un aumento di stress metabolico nel mitocondrio, con un'eccessiva fosforilazione ossidativa e la produzione di ROS, ad esempio attivando la NOS sintetasi  $\text{Ca}^{2+}$ -dipendente.

L'evidenza sperimentale indica che una disregolazione dello stato redox partecipa fortemente in una fase iniziale di AD, inducendo e attivando più vie di segnalazione cellulari che contribuiscono alla progressione iniziale del processo neurodegenerativo. Tutti questi dati supportano l'"ipotesi di stress ossidativo" di AD definendolo un evento chiave nell'insorgenza e progressione di tale patologia: questa teoria propone gli antiossidanti come strumenti terapeutici benefici nel trattamento di AD.

### **1.1.7 La cascata colinergica**

Una delle caratteristiche principali di AD è la diminuzione di acetilcolina (ACh) a livello neuronale. L'acetilcolina è un neurotrasmettitore sintetizzato generalmente nei neuroni dall'enzima colina acetil-transferasi utilizzando come substrato colina ed il gruppo acetile dell'acetil-CoA. L'enzima acetilcolinesterasi (AChE) è responsabile della degradazione di ACh e converte questa in colina. Tale enzima, presente nelle terminazioni nervose, presenta due siti di legame, PAS (sito attivo periferico) e CAS (sito attivo catalitico che ha i residui critici Ser200, Hys440, Glu327) (Fig. 5). L'acetilcolina può essere degradata anche da altre colinesterasi, quali

la butirrilcolinesterasi (BuChE), che però ha una minore affinità rispetto all'AChE.

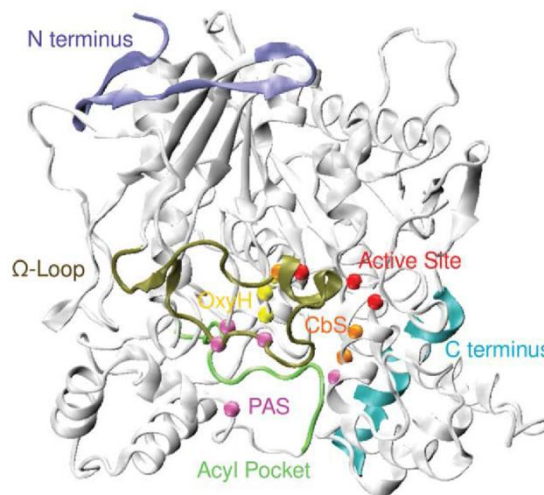


**Figura 5:** Meccanismo d'azione dell'ACh al sito attivo di AChE

Il *sito PAS* dell'AChE, localizzato all'entrata della gola del sito attivo, si compone di cinque residui (Tyr70, Asp72, Tyr121, Trp279 e Tyr334) (Fig. 6). Ad esso sono associati loop superficiali che gli conferiscono un elevato grado di flessibilità conformazionale. Oltre al ruolo di regolatore allosterico della catalisi nel sito attivo, il sito PAS è implicato anche in un certo numero di funzioni "non classiche", in particolare la deposizione di amiloide, l'adesione cellulare e lo sviluppo delle neuriti [9].

L'occupazione del PAS da parte del ligando può cambiare allostericamente la conformazione del sito attivo. I residui aromatici interni alla gola e i residui localizzati all'esterno del bordo della gola sono coinvolti nel legame iniziale e guidano il substrato verso il sito attivo.

L'AChE interagisce con Aβ e promuove la formazione di fibrille di amiloide attraverso un pool di aminoacidi localizzati in prossimità del sito PAS dell'enzima. E' stato dimostrato che le molecole che interagiscono esclusivamente con il PAS o con entrambi i siti di legame (catalitico e periferico), possono prevenire anche l'aggregazione di Aβ indotta dall'AChE [9].



**Figura 6:** Regioni strutturali di AChE

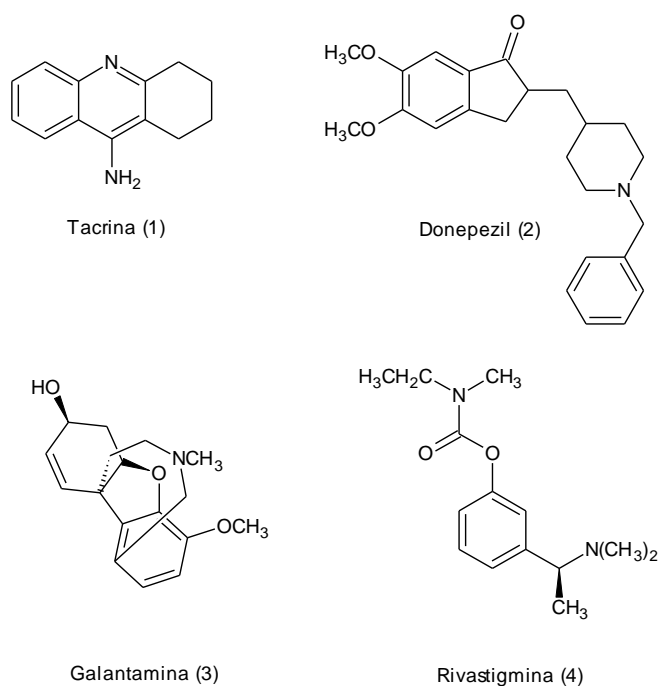
L'ipotesi di riduzione della funzionalità colinergica in AD è divenuta la base per la progettazione di una nuova classe di farmaci: gli inibitori dell'acetilcolinesterasi (AChEI). Molti studiosi hanno criticato tale ipotesi, basandosi sull'assenza di degradazione dei neuroni colinergici e sulla presenza di livelli elevati di colina O-acetiltransferasi (ChAT) nei primi stati dell'AD. E' stato infatti osservato che la degenerazione neuronale nell'AD non è dovuta semplicemente alla perdita di cellule, ma ad un processo degenerativo che inizia con il decrescere della stabilità e plasticità sinaptica: tale quadro patologico è caratteristico della prima fase dell'AD. Questo processo degenerativo è controbilanciato da un incremento dell'attività colinergica, mediato parzialmente dall'up-regulation di A $\beta$  che avviene in seguito al legame ai recettori dell'ACh  $\alpha 7$ -nicotinici. Queste osservazioni sono compatibili con l'efficacia degli AChEI nell'AD, e spiegano la successiva perdita di efficacia, dovuta alla diminuzione dei neuroni colinergici. Il recettore nicotinico dell'ACh (nAChR), agendo come recettore per A $\beta_{1-42}$ , provoca ingresso di  $Ca^{2+}$  nella cellula e determina una serie di risposte a valle che vanno dallo squilibrio dell'ERK (chinasi che regola i segnali extracellulari) all'interruzione della fosforilazione della proteina CREB, un fattore di trascrizione implicato nella formazione della memoria a lungo termine.

## **2. La terapia attuale di AD**

Allo stato delle attuali conoscenze per la terapia farmacologica della malattia di Alzheimer non disponiamo di un trattamento causale, ma soltanto di farmaci “sintomatici”. Appartenenti a questa classe si trovano gli inibitori dell’acetilcolinesterasi (donepezil, galantamina e rivastigmina), la memantina e gli antiossidanti (selegilina e vitamina E).

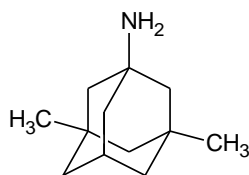
### **2.1 Gli inibitori di AChE**

Ad oggi gli inibitori dell’acetilcolinesterasi sono i farmaci di prima scelta nel trattamento di AD dal momento che i pazienti con tale malattia mostrano una diminuzione della concentrazione di ACh all'interno della fessura sinaptica. Allo stesso tempo è stata anche osservata una diminuzione dell'attività di ChAT, ed un'iperattività dell'AChE e della BuChE. La perdita della funzione colinergica è strettamente legata alla disfunzione cognitiva. Ciò ha portato allo sviluppo razionale della prima generazione di farmaci per AD, gli AChEIs. L'inibizione della AChE aumenta la concentrazione di ACh a livello del vallo sinaptico, rafforzando in tal modo la neurotrasmissione colinergica centrale. Gli inibitori dell’acetilcolinesterasi (AChEIs) approvati dalla FDA per il trattamento di AD sono: tacrina (1), donepezil (2), galantamina (3) e rivastigmina (4) (Fig. 7). Oggi la tacrina non è più utilizzata a causa della sua epatotossicità manifestata in circa il 50% dei pazienti. Gli altri tre AChEIs correntemente in uso offrono benefici modesti che consistono in un piccolo miglioramento dei sintomi (senza un chiaro effetto sulla progressione della malattia) ed effetti collaterali come confusione, allucinazioni, cambiamenti improvvisi nel comportamento, nausea o dolore allo stomaco. Tali farmaci sono indicati nella malattia di Alzheimer in fase lieve e moderata; possono migliorare alcuni sintomi cognitivi (come memoria e attenzione) e comportamentali (quali apatia, agitazione e allucinazioni), ma questa loro capacità diminuisce con la progressione della malattia.

**Figura 7: AChEIs**

## 2.2 Antagonisti NMDA

Un altro approccio al trattamento di AD consiste nel bloccare la neurotrasmissione glutammatergica. Il blocco del recettore NMDA con antagonisti non competitivi dovrebbe avere pertanto un effetto neuroprotettivo. La memantina (5), un'antagonista non competitivo dell'NMDA, è stato il primo farmaco non AChEI approvato dalla FDA per il trattamento di AD. E' indicata nella malattia di Alzheimer in fase moderatamente severa e severa, ed agisce compensando gli effetti tossici derivanti dall'eccessiva eccitazione delle cellule nervose causata dal glutammato, che, in situazioni patologiche, produce una quantità abnorme di  $\text{Ca}^{2+}$  nelle cellule nervose provocandone la morte.



Memantina (5)

**Figura 8:** Antagonista NMDA

### 3. Potenziali strategie terapeutiche in AD: il multitarget

Oltre alle sopracitate terapie in uso, sono in corso studi riguardanti diverse altre strategie terapeutiche per migliorare la ridotta efficacia dei farmaci a singolo bersaglio. Una di queste è la strategia del multitarget che si basa sulla combinazione appropriata di porzioni farmacoforiche, ritenute responsabili di attività farmacologiche distinte e magari complementari, in un'unica entità molecolare (farmaco multitarget), permettendo così una migliore efficacia terapeutica rispetto ai farmaci attualmente in uso.

#### 3.1 Antiossidanti multifunzionali

Come già discusso in precedenza, lo stress ossidativo riveste un ruolo chiave nella patogenesi dell'AD. Molecole dotate di attività antiossidante possono ridurre le concentrazioni di specie reattive dell'ossigeno (ROS) attraverso vari meccanismi quali ad esempio: (i) l'inibizione di enzimi pro-ossidanti come la lipossigenasi o la ciclossigenasi, (ii) la neutralizzazione dei radicali liberi o degli ioni dei metalli chelanti l'A $\beta$  amiloide, (iii) l'aumento dei livelli di antiossidanti endogeni, o attraverso (iv) l'aumento dell'espressione dei fattori di trascrizione sensibili alle sostanze redox.

Ad oggi una grande varietà di antiossidanti sono stati esaminati come neuroprotettori. I promettenti risultati di studi condotti in vitro e su modelli animali, non sono stati riscontrati in studi clinici. Ciò suggerisce che l'efficacia antiossidante non è l'unica cosa necessaria per modificare la progressione della patologia: gli antiossidanti che presentano effetti farmacologici aggiuntivi sono in grado di produrre effetti neuroprotettivi

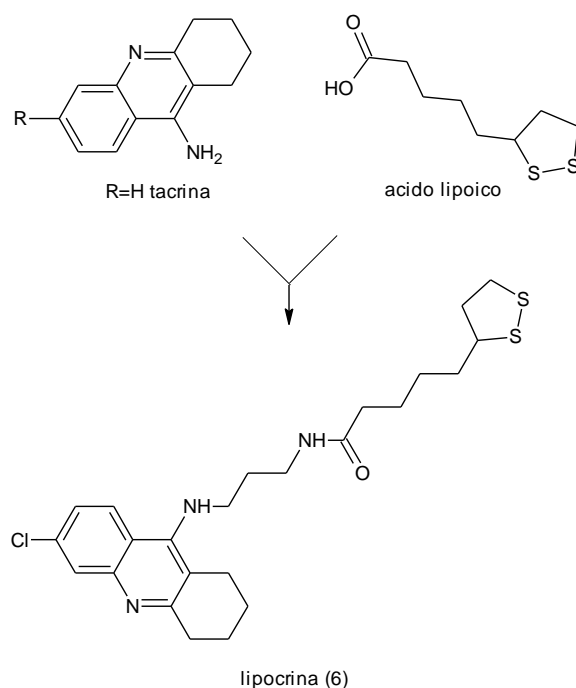


supplementari e offrono quindi una buona strategia terapeutica per il trattamento di questa complessa malattia.

Negli ultimi anni sono stati progettati molti agenti multifunzionali ottenuti dalla combinazione di molecole ad attività antiossidante e inibitori dell'acetilcolinesterasi.

Un primo esempio è rappresentato dalla lipocrina racemica (6, Fig. 9). Il composto risulta dalla combinazione, nella stessa molecola, della struttura dell'acido lipoico (LA, antiossidante) con un derivato della tacrina, il primo AChEI approvato per il trattamento di AD. L'evidenza sperimentale ha indicato che 6 potrebbe legare entrambi i siti, catalitico e periferico, della AChE e agire così come un inibitore di tipo misto. Questa interazione bivalente ha portato all'identificazione di uno dei più potenti AChEIs attualmente noti ( $IC_{50} = 0.25$  nM), capace di ridurre l'aggregazione A $\beta$  AChE-indotta ( $IC_{50} = 45$   $\mu$ M). Inoltre, LA ha contribuito al profilo multimodale di 6, proteggendo le cellule umane SH-SY5Y dalla formazione di ROS evocata da stress ossidativo (essendo 6 più attivo di LA) [10].

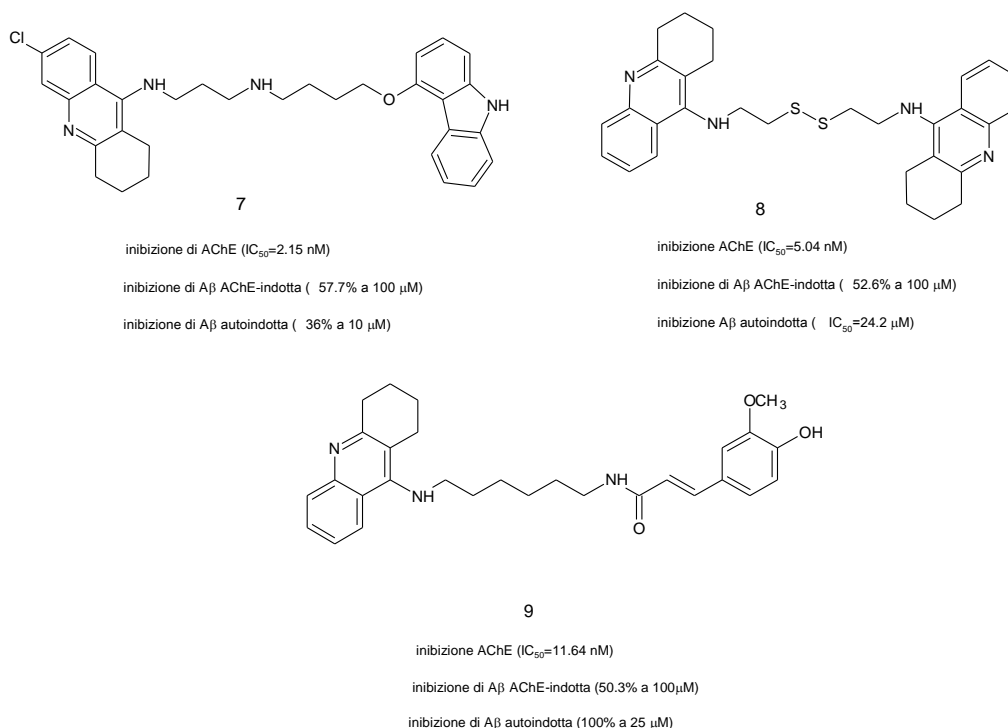
Nel 2011 lo studio dei due enantiomeri di 6, (S)-6 e (R)-6, ha indicato che la stereochimica di LA non è significativa per l'effetto protettivo contro il danno ossidativo cellulare mentre influenza, anche se non significativamente, la potenza inibitoria sull'AChE ((R)-6 vs (S)-6,  $IC_{50} = 0.23$  nM e 0.47 nM, rispettivamente). Il composto 6 è attualmente commercializzato come uno strumento farmacologico per lo studio di AD.



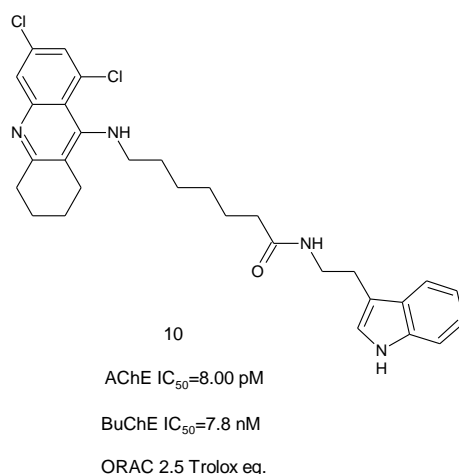
**Figura 9:** Ibrido tacrina-acido lipoico

Successivamente sono state sviluppate altre molecole multifunzionali in cui la tacrina è stata coniugata con molecole dotate di proprietà antiossidante quali il carbazolo, la cistamina e l'acido ferulico (FA). I composti 7-9 (Fig. 10) inibiscono sia l'attività catalitica di AChE che l'aggregazione A $\beta$  AChE-indotta ed inoltre esercitano un'azione antiossidante e/o neuroprotettiva.

Particolarmente interessante è il derivato 9 ottenuto dalla condensazione della tacrina con FA. Alcuni studi in vitro e in vivo hanno indicato un effetto neuroprotettivo, un ridotto accumulo intracellulare di ROS indotto dalla  $\beta$ -amiloide in cellule PC12 e una ridotta compromissione dell'apprendimento e della memoria su un modello di topi con AD. E' stato inoltre osservato un aumento dell'attività dell'acetilcolintransferasi (AChT) e l'inibizione dell' AChE ( $IC_{50} = 11.64$  nM). E' utile osservare che questa famiglia di derivati mantiene le proprietà antiossidanti del composto originario. Nel complesso, questi risultati indicano 9 come un antiossidante multifunzionale promettente per il trattamento di AD [11].

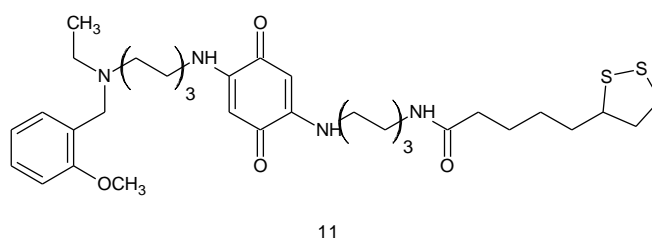
**Figura 10:** Ibridi di tacrina

Un altro ibrido basato sulla struttura della tacrina è il composto 10 (Fig. 11) ottenuto attraverso la combinazione della tacrina con la melatonina, un neuro-ormone che possiede forti proprietà antiossidanti e che funge anche da scavenger per alcune specie ROS rafforzandone la funzione neuroprotettiva. Tale composto è risultato essere un altro potente inibitore della AChE ( $IC_{50} = 8$  pM) dotato di buona selettività AChE rispetto a BuChE. E' inoltre dotato di ottime capacità antiossidanti e presenta un buon profilo drug-like mostrando una buona capacità di superare la BEE [12].



**Figura 11:** Ibrido tacrina-melatonina

Altro composto degno di nota è il derivato 11 (Fig. 12) ottenuto dalla combinazione del farmaco memochina con LA. Memochina è una molecola dotata di attività multipla in quanto agisce come inibitore dell'AChE e del BACE1, possiede proprietà antiossidanti ed è stato riportato che migliora lo squilibrio cognitivo indotto dall'A $\beta$  [13]. Il nuovo ibrido 11 mostra una buona attività inibitoria dell'AChE ( $IC_{50}$  = 0.1  $\mu$ M) e selettività, 50 volte più potente contro l'AChE; riduce con successo l'aggregazione A $\beta$  fino al 45.4% a 10  $\mu$ M. La molecola è inoltre dotata di attività antiossidante ed ha la capacità di diminuire la produzione di ROS a livelli basali.



**Figura 12:** Ibrido memochina-acido lipoico

### 3.2 Gli inibitori dell'AChE e i bloccanti del canale calcio

Come già affermato, il sovraccarico di  $\text{Ca}^{2+}$  è una delle principali cause che avviano i processi che portano alla morte cellulare. Molte prove hanno dimostrato che la disfunzione di  $\text{Ca}^{2+}$  è coinvolta nella patogenesi di AD, aumentando la formazione di A $\beta$  e la *tau* iperfosforilazione. In condizioni patologiche, l'ingresso di  $\text{Ca}^{2+}$  attraverso i canali-L provoca un sovraccarico dello stesso ione e la rottura mitocondriale, portando all'attivazione della cascata apoptotica e alla morte cellulare. La modulazione del  $\text{Ca}^{2+}$ , entrato attraverso questo specifico sottotipo di canale, potrebbe essere una strategia efficace per prevenire la morte cellulare.

I composti 12, 13 e 14 (Fig. 13) sono stati sviluppati in un ampio programma rivolto alla disomeostasi di  $\text{Ca}^{2+}$  prodotta nella progressione patologica di AD. Sono ibridi di tacrina e di 1,4-diidropiridine (modulatori del canale al  $\text{Ca}^{2+}$  voltaggio dipendente, VDCC). Il derivato 12, recante il nucleo 4H-pirano [2,3-*b*] chinolinico, inibisce selettivamente l'AChE con  $\text{IC}_{50}$  di 1.86  $\mu\text{M}$  e riduce fino al 43% l'aumento citosolico di  $\text{Ca}^{2+}$ . Questo composto mostra inoltre un effetto neuroprotettivo in modelli in vitro; tuttavia non è ancora chiaro il meccanismo di neuroprotezione.

Il composto 14, nominato tacripyrine, è stato recentemente sviluppato come capostipite di antagonisti AChEIs-VDCC di terza generazione. In questo derivato, la porzione 1,4-diidropiridinica è "fusa" nel nucleo tetraidroacridinico della tacrina. Risulta essere l'inibitore AChE più potente con una  $\text{IC}_{50}$  di 45 nM (4 volte più potente di tacrina) e altamente selettivo, 2000 volte più attivo contro l'AChE rispetto alla BuChE. Il composto mostra anche effetti neuroprotettivi grazie alla riduzione dell'apoptosi indotta da sovraccarico di  $\text{Ca}^{2+}$  e dallo stress ossidativo [14].

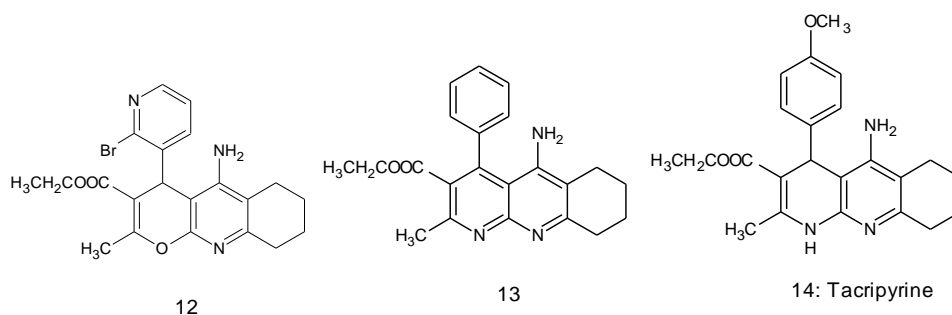


Figura 13: Ibridi tacrina-1,4-diidropiridine

### 3.3 Inibitori AchE e NMDAR

Il composto 15 (Fig. 14) è il risultato della combinazione della tacrina con il nucleo carbazolico del carvedilolo, un vasodilatatore  $\beta$ -bloccante ed un antiossidante approvato per il trattamento dell'ipertensione, che mostra bassa affinità per il recettore NMDA. Il profilo farmacologico del composto 15 può essere riassunto come segue:

- buona attività anticolinesterasica ( $IC_{50} = 2.15$  nM) e buona selettività;
- attività inibitoria sia dell'aggregazione  $A\beta$  AChE-indotta che quella autoindotta;
- attività antagonista NMDAR ( $IC_{50} = 0.74$   $\mu$ M) migliore del carvedilolo;
- effetto neuroprotettivo contro la formazione dei ROS e buona attività antiossidante.

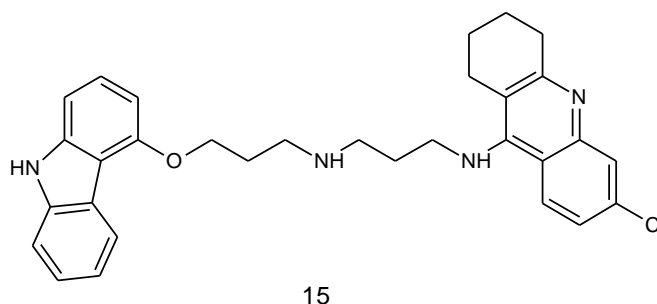
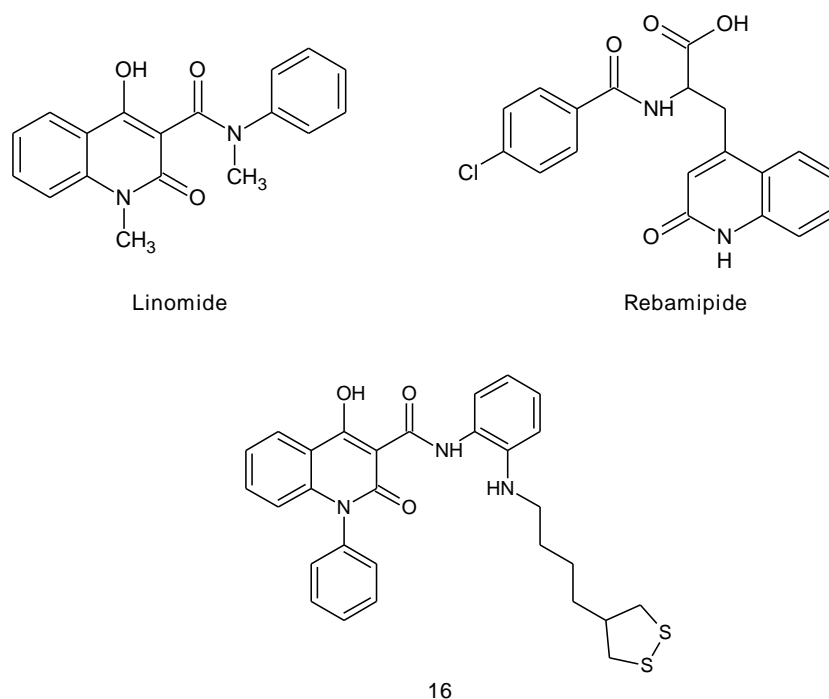


Figura 14: Ibrido tacrina-carvedilolo

### 3.4 Antiossidanti e antinfiammatori

Come discusso in precedenza, lo stress ossidativo è una delle vie patologiche più importanti in AD ed è stato ampiamente studiato portando alla scoperta di molecole multitarget o MTDLs con proprietà antiossidanti (di cui sopra). In questa linea, è stato progettato il composto 16 (Fig. 15), una nuova molecola antiossidante che presenta anche l'attività anti-infiammatoria. In effetti l'infiammazione è un processo che si correla bene alla patologia di AD. In passato, molti FANS sono stati studiati come potenziali farmaci destinati all'infiammazione della glia, ma sono stati segnalati studi clinici infruttuosi; tuttavia, l'infiammazione continua ad essere un obiettivo chiave nello sviluppo di farmaci contro AD.

La struttura del chinolinone comprende motivi che sono caratteristici di numerosi prodotti naturali e analoghi sintetici, che presentano una grande varietà di attività biologiche. Linomide (Fig. 15) è un prodotto sintetico immunomodulatore utilizzato come punto di partenza per l'ottimizzazione di diversi analoghi. Rebamipide (Fig. 15), un altro esempio di derivato chinolinonico, ha un efficace effetto antiossidante, è scavenger di specie ROS e induce una sovraespressione di prostaglandine endogene. Sulla base di queste osservazioni, la struttura della chinolina è stata coniugata con l'acido lipoico per dare il composto 16.



**Figura 15:** Antiossidanti e antinfiammatori

### 3.5 Inibitori multitarget di chinasi

Benché la formazione di aggregati della proteina *tau* abbia evidenziato l'importanza di queste strutture aberranti nella patologia di AD, nessun farmaco capace di interrompere direttamente questo processo patologico ha ancora raggiunto la clinica.

Recentemente, gli sviluppi degli inibitori di chinasi procedono principalmente come inibitori multitarget delle chinasi. Questi nuovi inibitori hanno come targets diverse proteine chinasi, con il giusto equilibrio di inibizione per ciascuna. Recentemente sono stati descritti inibitori a doppia-specificità di CDK e CK-1, basati sulla struttura di roscovitine (CYC202 o Seliciclib) (Fig. 16), un inibitore di diverse chinasi (DYRK1A, CK1, chinasi piradossale).

Il derivato purinico 17 (Fig. 16) ha mostrato attività inibitoria nei confronti di CK1 ( $IC_{50} = 14$  nM), CDK5 ( $IC_{50} = 80$  nM), GSK3 $\beta$  ( $IC_{50} = 4.1$   $\mu$ M) e CDK1 ( $IC_{50} = 0.22$   $\mu$ M).



Un'altra interessante classe di composti è rappresentata dal composto 18, a struttura tiadiazolidindionica (Fig. 16). E' un potente inibitore selettivo della GSK3 $\beta$  e un'agonista del recettore nucleare PPAR $\gamma$ , che mostra proprietà antinfiammatorie e neuroprotettive efficaci. Entrambe le proprietà potrebbero costituire un significativo passo in avanti in ulteriori sviluppi degli inibitori multitarget GSK3 $\beta$ .

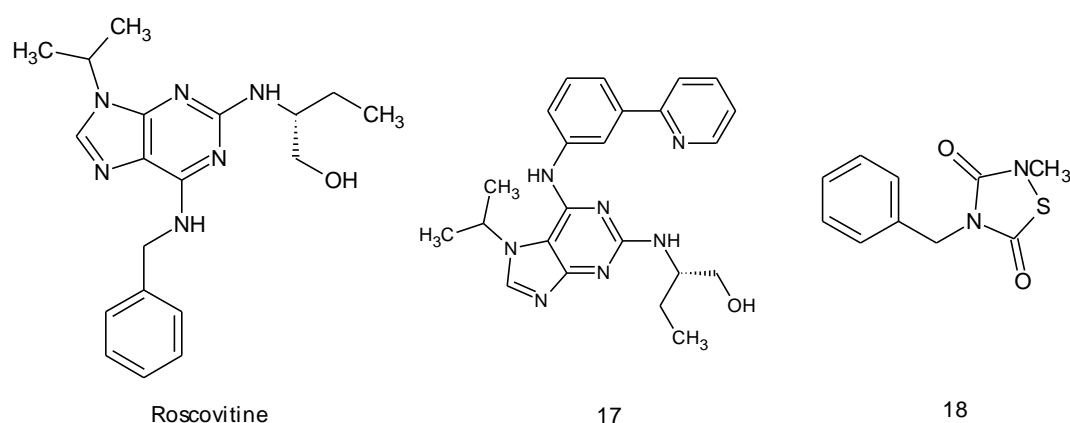


Figura 16: Inibitori multitarget di chinasi

### 3.6 Chelanti multitarget dei metalli

I chelanti dei metalli hanno la capacità di attenuare un ampio spettro di attività corresponsabili della patogenesi dell'AD, quali ad esempio lo stress ossidativo, l'aggregazione di A $\beta$  e la formazione di NFTs. Non ci sono evidenze che AD risponda ai chelanti tradizionali. Il rischio principale nell'utilizzo di tali composti consiste nella rimozione di ioni metallici essenziali per l'organismo con conseguenti effetti collaterali.

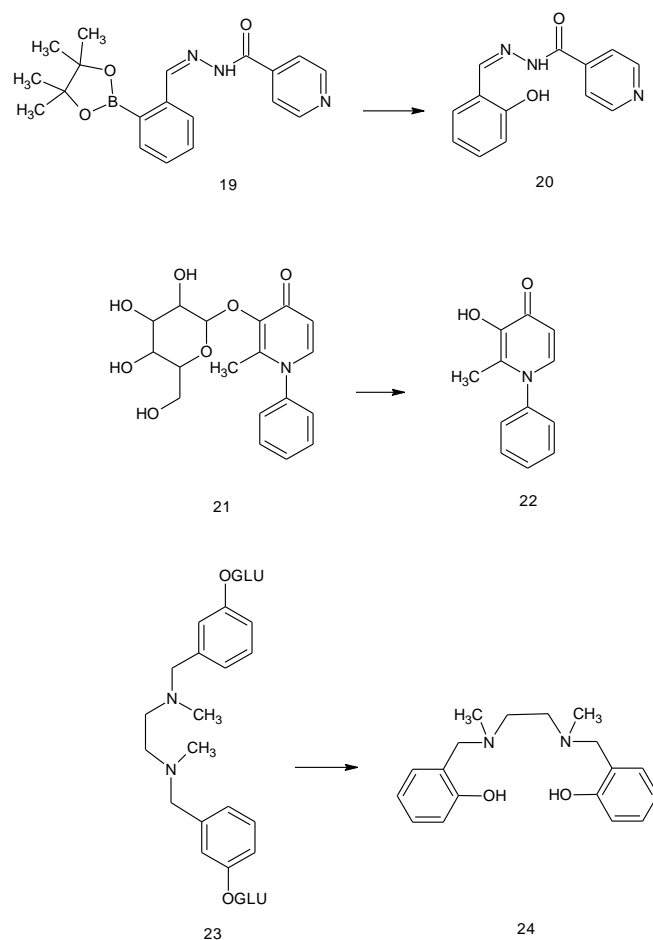
Nelle placche  $\beta$ -amiloidi è stata rilevata, attraverso studi di spettroscopia, un'elevata concentrazione del Cu<sup>2+</sup> [6]. Il Cu<sup>2+</sup> può interagire con la proteina  $\beta$ -amiloide e promuovere la sua aggregazione negli studi in vitro. La modulazione del Cu<sup>2+</sup> nel cervello potrebbe quindi dare beneficio al trattamento del morbo di Alzheimer, in quanto è evidente

che l'attività redox degli ioni metallici come il  $\text{Cu}^{2+}$  contribuisce alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS).

Su queste basi, sono stati sviluppati alcuni chelanti o prochelanti con migliore specificità per i metalli coinvolti nella patologia. Una delle prime molecole basate su questo approccio è un prochelante che non ha affinità per gli ioni metallici fino a quando è "mascherato" (da un estere boronico pinacologico). In assenza di stress ossidativo la molecola mascherata è un ligando debole e non altera la distribuzione di ioni; in condizioni patologiche, quando le ROS sono elevate, il composto viene smascherato e si rivela un potente chelante del ferro. Sebbene sia il farmaco 19 che il 20 non siano considerati farmaci multitarget, sono stati i primi pro-chelanti che hanno aperto una nuova linea di ricerca al fine di diminuire la chelazione non discriminante dei biometalli.

Con questo approccio, sono stati sviluppati i pro-farmaci 21 e 22 che hanno come porzione chelante del  $\text{Fe}^{3+}$  e del  $\text{Cu}^{2+}$  l'idrossipiridinone. La porzione zuccherina svolge la funzione di carrier permettendo il superamento della BEE alla molecola la quale viene successivamente idrolizzata. Questo aspetto è importante e restringe la cerchia dei chelanti dei metalli, in quanto non tutti possiedono le caratteristiche chimiche idonee per l'attraversamento della barriera ematoencefalica. E' stato dimostrato che entrambi riducono l'aggregazione  $\text{A}\beta_{1-40}$  del 60% a 50  $\mu\text{M}$  [15].

Analogamente, i farmaci 23 e 24 hanno mostrato proprietà chelanti verso lo  $\text{Zn}^{2+}$  e il  $\text{Cu}^{2+}$ . Riducono l'aggregazione  $\text{A}\beta$  del 50% a 50  $\mu\text{M}$ . Inoltre si sono dimostrati buoni antiossidanti, 1.5 volte più potenti di Trolox (Fig. 17).



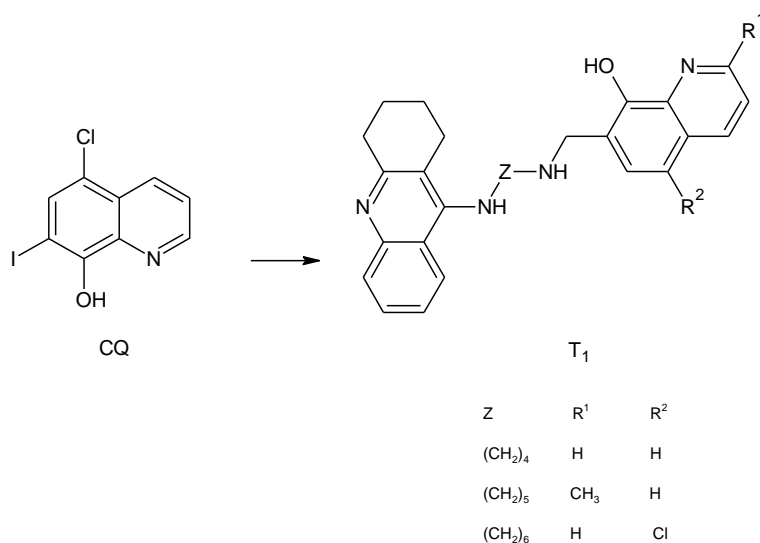
**Figura 17:** Chelanti dei metalli

### 3.7 Ibridi multifunzionali di tacrina

Al momento l'interesse per la disomeostasi degli ioni metallici come fattore patogenico e il suo ruolo come bersaglio nelle malattie neurodegenerative è stato stimolato, oltre che dall'ipotesi dei metalli di AD, dalla conseguente scoperta del cliochinolo (CQ, Fig. 18) come nuova strategia terapeutica per AD. La tossicità avversa riscontrata dal primo prototipo ha proposto altri chelanti dei metalli, alcuni di loro precedentemente usati come farmaci in disordini da eccesso di metalli.

Una serie di ibridi multifunzionali tacrina-8HQ (8HQ, nucleo di CQ) hanno mostrato un'interessante attività biologica in vitro per il trattamento di AD, comprese proprietà colinergiche, antiossidanti, leganti il Cu e neuroprotettive. Rispetto alla molecola tacrina questi ibridi mostrano una

migliore inibizione di AChE e BuChE senza effetti tossici collaterali. Uno di questi ibridi è T1 (Fig. 18) che ha mostrato migliori proprietà antiossidanti rispetto a Trolox. T1 interagisce con il PAS e questo può essere benefico per diminuire l'aggregazione di A $\beta$  indotta da AChE e i conseguenti danni ai neuroni colinergici [16].



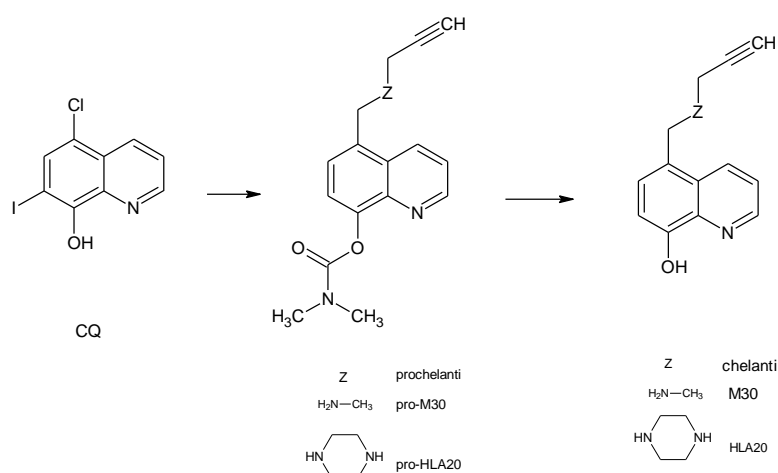
**Figura 18:** Ibrido tacrina-8HQ

### 3.8 Inibitori duali AChE-MAO

Nonostante il sistema colinergico sia stato intensamente studiato in AD, molti cambiamenti nei profili depressivi osservati in AD sono stati associati con un significativo decremento della concentrazione di dopamina. Inoltre il cervello dei pazienti affetti da AD ha mostrato un'aumentata attività delle MAO, un enzima che catalizza l'abbattimento di dopamina e produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causando un aumentato stress ossidativo.

Studi recenti forniscono i chelanti dei metalli con proprietà MAO inibitorie come potenziali terapeutici in AD. La combinazione di inibitori duali AChE-MAO nel chelante 8HQ con proprietà antiossidanti ha portato alle molecole funzionali pro-M30 e pro-HLA20. La strategia di mascherare il gruppo idrossilico nel sito di legame attraverso la funzionalità carbammato ha diversi vantaggi: i) simula la rivastigmina nell'inibizione

dell'AChE e ii) può essere attivato successivamente dall'AChE dopo assorbimento nel cervello, rilasciando un chelante degli ioni metallici. Le nuove molecole pro-M30 e pro-HLA20 inibiscono l'attività dell'AChE, in particolare pro-M30; tuttavia, a differenza della rivastigmina, entrambi i composti hanno mostrato una minore inibizione della BuChE. I chelanti mascherati sono meno citotossici e più lipofili rispetto ai rispettivi chelanti attivi (M30 e HLA20). M30 e HLA20 sono MAO inibitori e hanno un'azione neuroprotettiva nella diminuzione della precipitazione di A $\beta$  in linee cellulari con AD [17].




**Figura 19:** Inibitori duali AChE-MAO

#### 4. Conclusioni e sviluppi futuri

Data la complessità eziologica della patologia di AD, le strategie terapeutiche più studiate per lo sviluppo di nuovi potenziali farmaci per il trattamento dell'AD possono essere riassunte come segue:

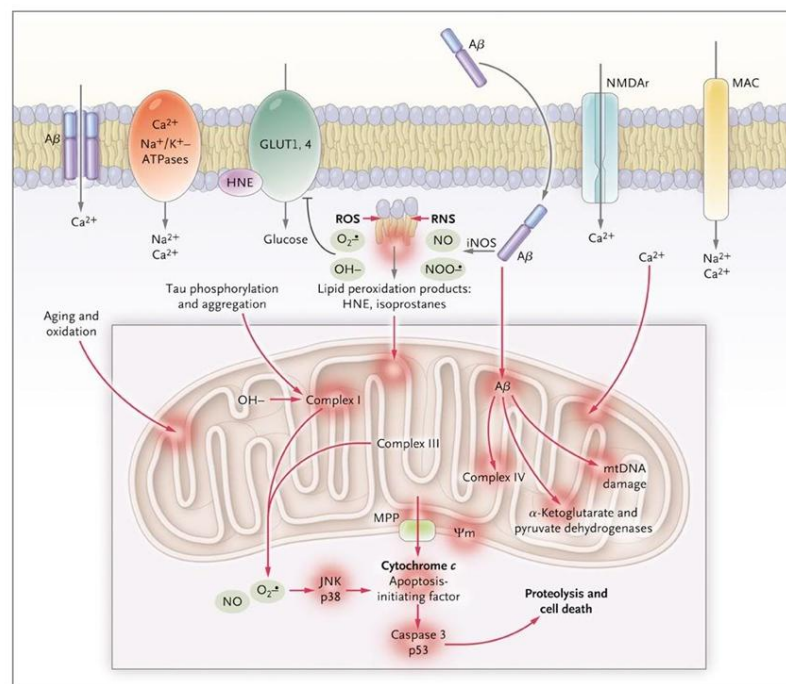
- coniugazione di due o più agenti terapeutici che agiscono su aspetti diversi della malattia: *multi-target-directed-ligands* (MTDLs);
- sviluppo dei *dual-binding-site-AChEIs* in grado di interagire simultaneamente con il sito catalitico e il sito periferico dell'AChE;
- coniugazione di un AChEI ad una molecola con proprietà antiossidanti;
- molecole che agiscono sia da scavenger dei radicali liberi che da chelante.

Alla luce di ciò, lo scopo di questa tesi è la sintesi e la valutazione farmacologica di una nuova combinazione molecolare ottenuta coniugando antiossidanti noti con la tacrina.



# **Introduzione alla parte sperimentale**

Il morbo di Alzheimer è la più comune forma di demenza irreversibile nell'anziano. L'eziologia dell'AD non è completamente nota, tuttavia ci sono diversi fattori che giocano un ruolo decisivo nella sua fisiopatologia, tra cui la diminuzione dei livelli di ACh, la formazione di depositi di A $\beta$  e di grovigli neurofibrillari e la disfunzione mitocondriale (Fig. 20).



**Figura 20:** Stress ossidativo e disfunzioni mitocondriali nell'AD

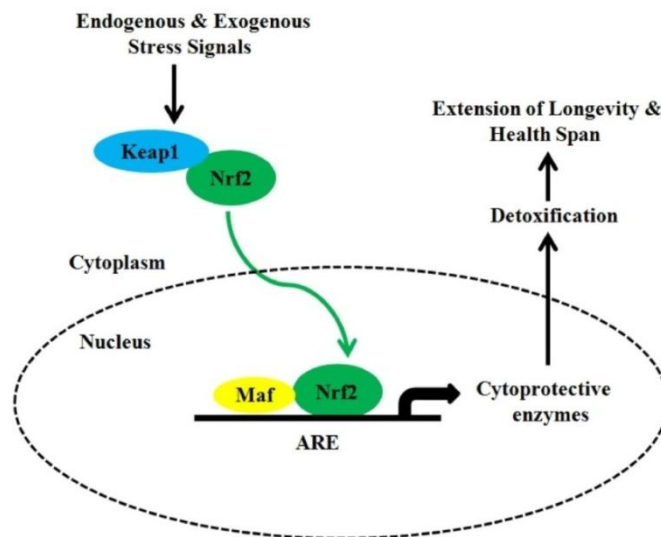
La maggior parte di questi processi patologici è associata alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) che causano stress ossidativo e conseguenti alterazioni dei costituenti molecolari essenziali quali lipidi, proteine e DNA. Su questa base è evidente come, sia l'aumentata produzione di ROS che il danno ossidativo rivestano un ruolo fondamentale nell'insorgenza e nella progressione dei disordini neurodegenerativi come l'AD.

Il SNC è dotato di meccanismi ad attività antiossidante che sono costituiti essenzialmente da sistemi enzimatici atti a mantenere il corretto



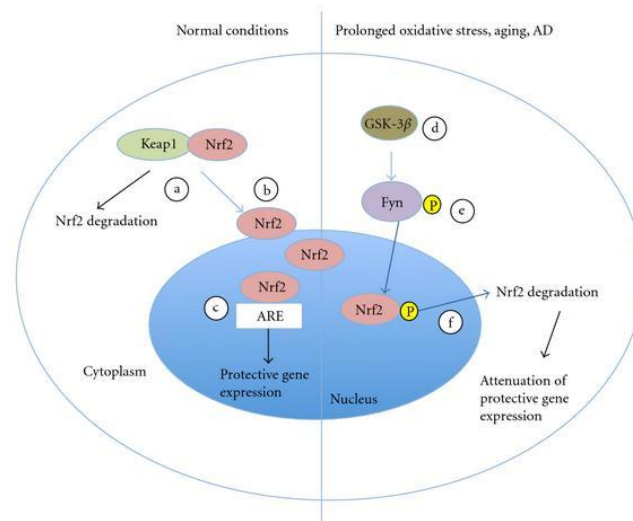
equilibrio tra le varie specie redox. L'espressione di tali enzimi è fortemente controllata dall'*ARE* (*antioxidant response element*) ed è attivata dal fattore nucleare Nrf2 (*nuclear factor E2-related factor 2*), a sua volta attivato dallo stress ossidativo.

Lo stress ossidativo, così come alcuni composti endogeni e di sintesi, è in grado di perturbare il complesso tra Nrf2 e Keap1 e provocare la traslocazione nucleare di Nrf2. A seguito della formazione di un eterodimero con la proteina MAF, Nrf2 si lega alla sequenza ARE promuovendo così la trascrizione di numerosi geni codificanti gli enzimi detossificanti (Fig. 21).



**Figura 21:** Rappresentazione schematica del pathway Nrf2/ARE

In condizioni patologiche, come ad esempio in presenza di stress ossidativo, l'attività del pathway Nrf2/ARE è alterata a causa della iperattivazione di GSK-3 $\beta$ , regolatore negativo di Nrf2. In tali condizioni Nrf2 subisce una fosforilazione e traslocazione dal nucleo al citosol e successiva degradazione. La riduzione, quindi, della concentrazione di Nrf2 nel nucleo induce un drastico calo dell'espressione genica di enzimi detossificanti (Fig. 22).



**Figura 22:** Attivazione del pathway Nrf2-ARE in condizioni normali e patologiche e ruolo di GSK-3 $\beta$  come regolatore negativo di Nrf2: in *condizioni non patologiche* (a) avviene l'idrolisi del complesso Keap1-Nrf2 nel citosol; (b) i ROS alterano l'interazione tra Nrf2 e il suo repressore (Keap1) provocando così un aumento di Nrf2 nel citoplasma e conseguente traslocazione nel nucleo; (c) Nrf2 nel nucleo si lega all'ARE aumentando così l'espressione di geni protettivi Nrf2-indotti. In *condizioni di stress ossidativo* (d) GSK-3 $\beta$  è attivato; (e) GSK-3 $\beta$  fosforila Fyn provocando la sua traslocazione nel nucleo; (f) la Fyn nucleare fosforila Nrf2 provocando la sua estrusione dal nucleo e successiva degradazione citosolica.

Sulla base di tali dati, è evidente come la formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) rivesta un ruolo determinante nella comparsa e nella progressione dell'AD [18]. Per questo, nell'ultimo decennio, sono state saggiate numerose molecole ad attività antiossidante con lo scopo di valutarne le proprietà neuroprotettive. I risultati degli studi in vitro e condotti su modelli animali sembrano essere molto promettenti, ma purtroppo questi dati non sono stati confermati dagli studi clinici [19].

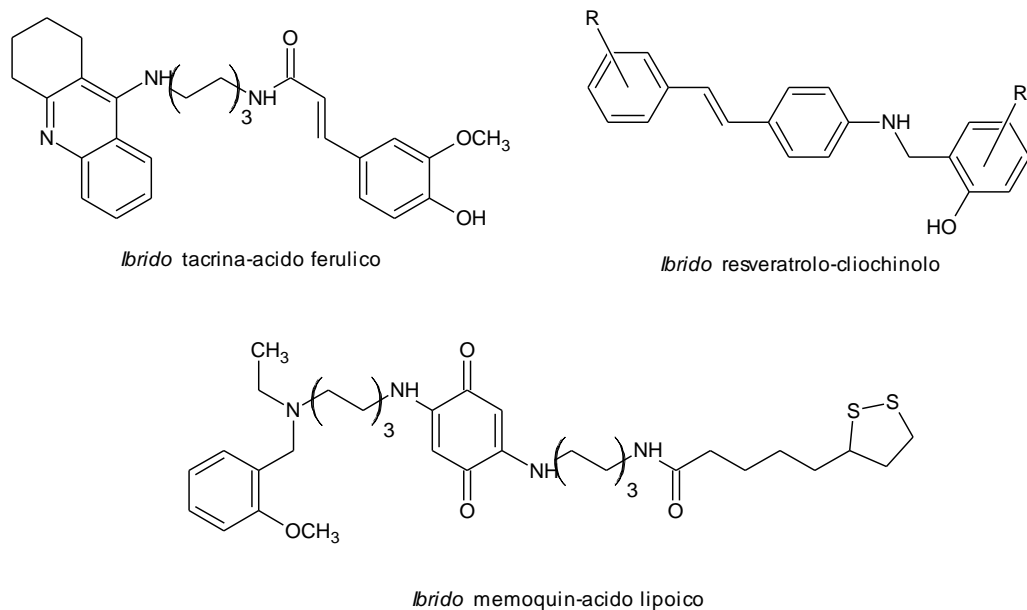
Il limite dell'utilizzo di antiossidanti come farmaci per la terapia dell'AD potrebbe essere spiegato attraverso una critica valutazione della complessità e del carattere multifattoriale della patologia stessa.

La molteplicità dei processi patologici che risultano implicati sia nell'eziologia che nella progressione dell'AD ha invalidato lo sviluppo di

farmaci in grado di modificare in modo significativo il decorso della neurodegenerazione attraverso l'approccio noto come "one molecule-one target".

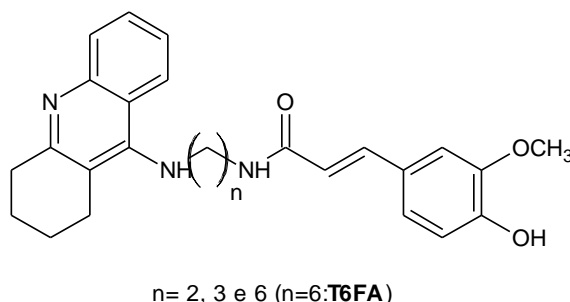
La strategia sintetica ampiamente studiata in questi ultimi anni si basa sullo sviluppo di nuove molecole in grado di agire simultaneamente su diversi processi patologici coinvolti nell'AD (approccio multitarget).

In particolare sono riportati in letteratura numerosi esempi di ibridi dotati di proprietà neuroprotettive, ottenuti dalla coniugazione di molecole ad attività antiossidante e molecole affini ad altri target biologici implicati nel processo degenerativo (come ad esempio AchE, biometalli, BACE etc, Fig. 23).



**Figura 23:** Ibridi neuroprotettivi

Basandosi su questo tipo di approccio, nel laboratorio presso il quale è stata svolta questa tesi di laurea e in collaborazione con il Prof. Pi, Sun Yat-Sen University, fu inizialmente progettata e sintetizzata una limitata serie di molecole ibride ottenute dalla coniugazione della tacrina (AChEI) con l'acido ferulico (antiossidante), attraverso dei linker lineari diamminici a 2, 3 e 6 atomi di carbonio (Fig. 24) [20].

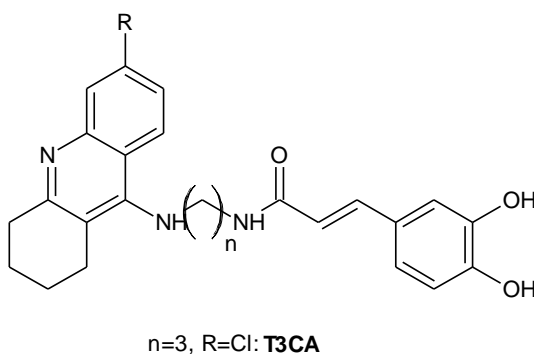


**Figura 24:** Ibridi tacrina-acido ferulico

Tra i composti sintetizzati il derivato T6FA (Fig. 24), è risultato essere il migliore della serie. In particolare T6FA in test *in vitro* e *in vivo* ha mostrato di inibire simultaneamente l'AChE e l'aggregazione di A $\beta$  AChE-indotta e di avere proprietà antiossidanti. Inoltre, uno studio *in vitro*, volto all'approfondimento dei meccanismi alla base dell'attività neuroprotettiva di T6FA, ha dimostrato che questa molecola è in grado di prevenire la morte cellulare indotta dallo stress ossidativo attraverso l'attivazione del pathway Nrf2/ARE in cellule HT-22 [21].

Altre molecole sviluppate dallo stesso gruppo di ricerca nell'ambito di questo progetto sono gli ibridi tacrina-acido caffeico [22]. L'acido caffeico, oltre alle proprietà antiossidanti dell'acido ferulico presenta anche un'attività anti-infiammatoria.

Da questo studio è inoltre emerso che la presenza di un atomo di cloro in posizione 6 della tacrina è in grado di aumentare l'affinità e la selettività verso l'AChE. Tra i composti appartenenti a questa serie il derivato T3CA (Fig. 25) ha mostrato una buona attività AChEI e ottima selettività rispetto alla BuChE ( $IC_{50}$  AChE =  $0.3 \pm 0.1 \mu M$  e  $IC_{50}$  BuChE =  $29.5 \pm 0.5 \mu M$ , BuChE/AChE  $IC_{50}$  =  $93.8 \mu M$ ). Possiede buone proprietà antiossidanti confrontabili con quelle dell'acido caffeico stesso ( $IC_{50}$  =  $4.8 \pm 0.9 \mu M$  vs  $5.7 \pm 0.4 \mu M$ ) ed inoltre ha mostrato una buona capacità inibitoria dell'aggregazione A $\beta$  indotta da AChE.

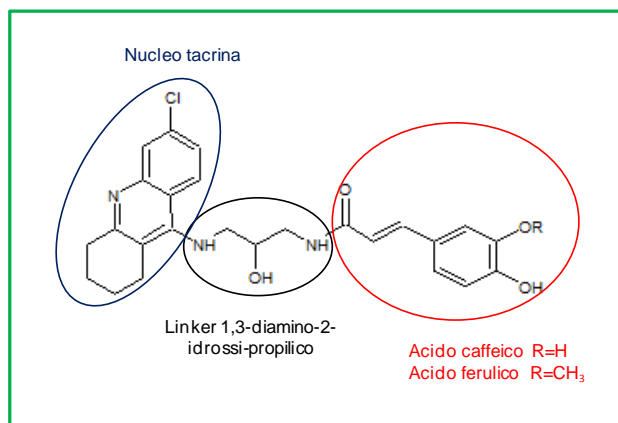


**Figura 25:** Ibrido tacrina-acido caffeico

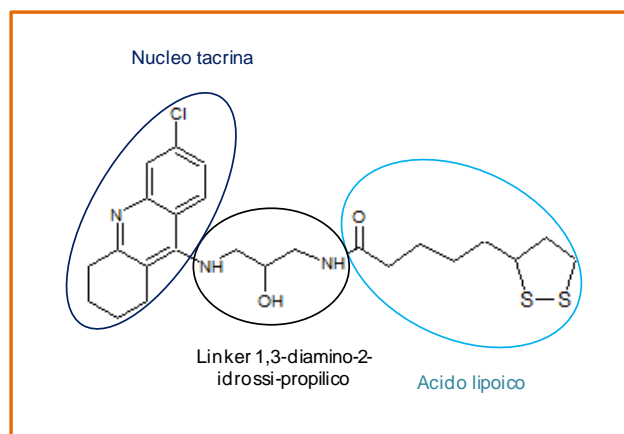
Su queste basi, in questa tesi di laurea, è stata affrontata la sintesi di nuove molecole multifunzionali ottenute dalla condensazione della tacrina con vari agenti antiossidanti. In particolare sono stati sintetizzati i composti **1-3** in cui la tacrina è stata opportunamente coniugata con l'acido caffeico (composto **1**), l'acido ferulico (composto **2**) e l'acido lipoico (composto **3**) attraverso il linker 1,3-diamino-2-idrossi-propilico.

La scelta di tale linker è motivata dal fatto che questa porzione molecolare potrebbe dotare la molecola multifunzionale di una ulteriore proprietà farmacologica che è quella di chelare metalli quali Cu e Zn, coinvolti nella formazione di depositi insolubili di A $\beta$  amiloide a carico del SNC.

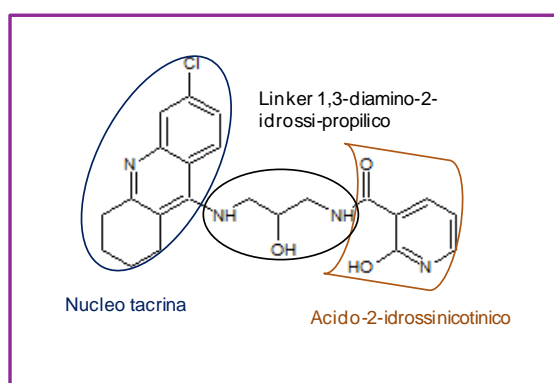
Inoltre in questa tesi di laurea viene descritta la sintesi del composto **4** in cui la tacrina è stata opportunamente coniugata con l'acido 2-idrossinicotinico che è capace di complessare metalli come Cu e Zn [23].



- 1 R=H
- 2 R=CH<sub>3</sub>



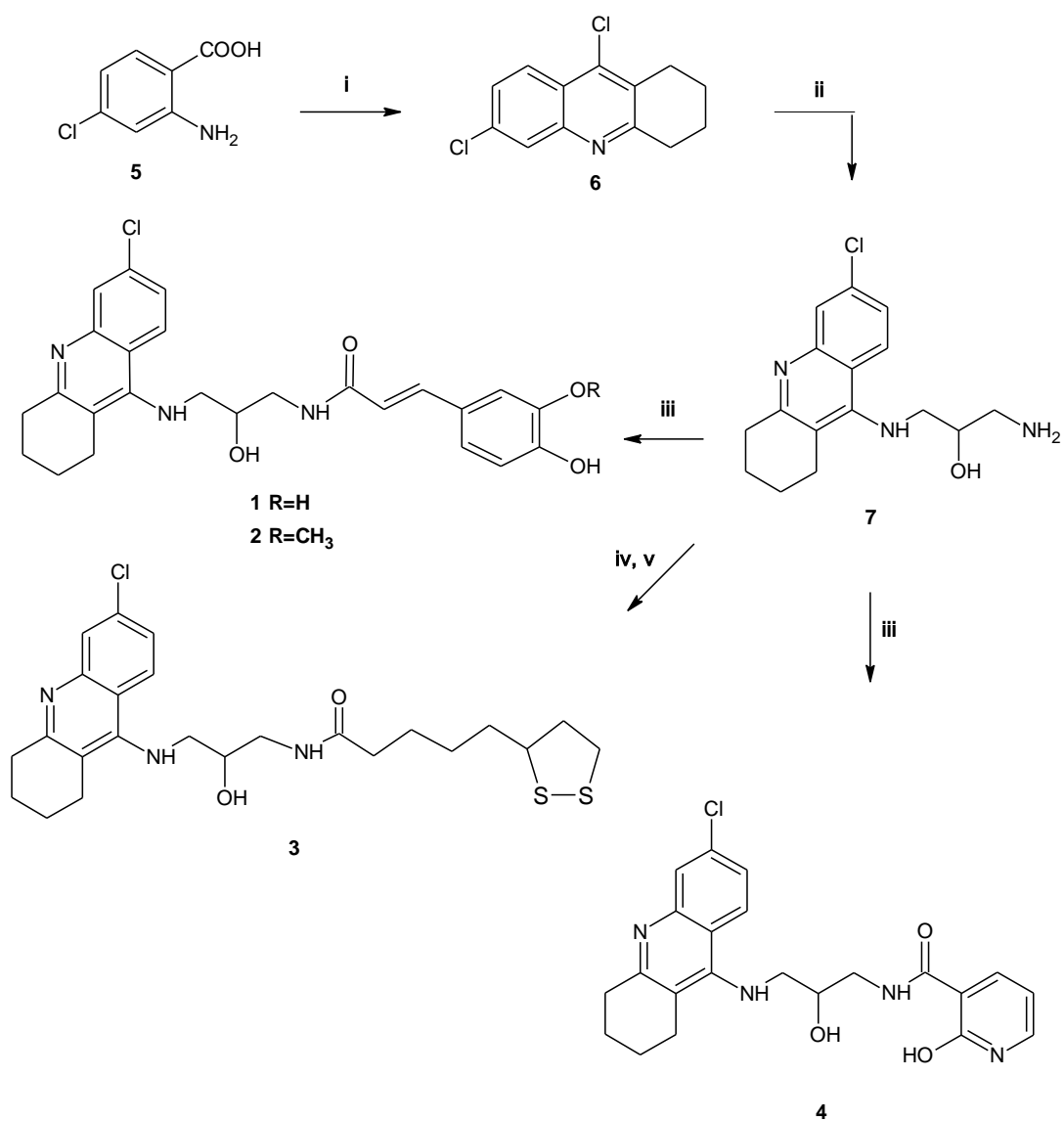
3



4

Per effettuare la sintesi dei composti **1-4** è stata seguita la procedura riportata nello **schema 1**.

### SCHEMA 1



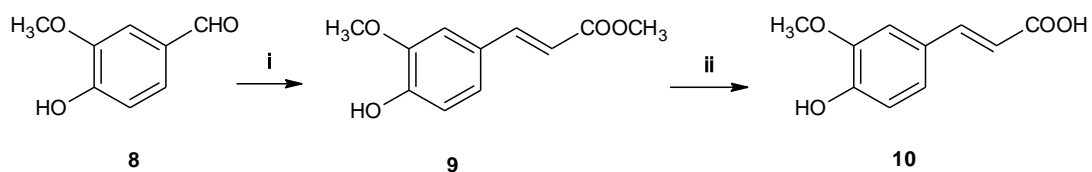
**Reagenti e condizioni:** (i) cicloesanonone,  $\text{POCl}_3$ , riflusso, 2 h; (ii) 1,3-diamino-2-propanolo,  $160^\circ\text{C}$ , 3 h; (iii) opportuno acido carbossilico,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ , DCC, cat. DMAP, t.a, 20 h; (iv) acido lipoico,  $\text{SOCl}_2$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 4 h; (v)  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{DMF}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , 4 h.

I derivati **1-4** sono stati preparati come descritto nello **schema 1**. L'intermedio **6** è stato sintetizzato tramite una reazione di disidratazione tra acido-2-amino-4-clorobenzoico e cicloesanonone, in presenza di  $\text{POCl}_3$ . Il derivato **6** è stato successivamente sottoposto ad una reazione di sostituzione con l'1,3-diamino-2-propanolo a dare il derivato **7**. I composti desiderati **1**, **2** e **4** sono stati sintetizzati tramite reazioni di condensazione tra la 6-cloro-tacrina (**7**) e gli opportuni acidi carbossilici (acido caffeico, acido ferulico e acido 2-idrossi-nicotinico, rispettivamente) in presenza di DCC e DMAP. Il derivato **3**, invece, è stato ottenuto per reazione del cloruro dell'acido lipoico, precedentemente preparato, con il derivato **7**, in presenza di  $\text{Et}_3\text{N}$ .



Per quanto riguarda invece i composti **9** e **10**, è stata seguita la via sintetica proposta nello **SCHEMA 2**.

## SCHEMA 2



**Reagenti e condizioni:** (i) metossicarbonilmetilen-trifenilfosforano,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , DBU, riflusso, 24 h; (ii)  $\text{NaOH}$  (10%),  $\text{MeOH}$ , riflusso 1 h.

L'acido ferulico **10** è stato preparato come mostrato nello **schema 2**. La reazione di Wittig tra la vanillina e il metossicarbonilmetilen-trifenilfosforano ha fornito il derivato **9**. La successiva idrolisi alcalina ha condotto al prodotto **10** desiderato.



## **Parte sperimentale**

## Materiali e metodi

La struttura di tutti i composti è stata controllata per mezzo della spettrometria  $^1\text{H}$ -NMR. Degli spettri  $^1\text{H}$ -NMR sono stati riportati i particolari più significativi. Tutti i composti sintetizzati presentano dati spettroscopici in accordo con le strutture assegnate.

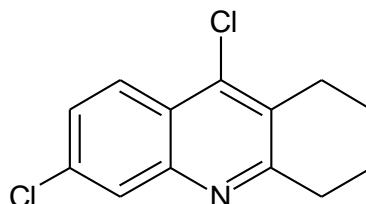
Gli spettri di risonanza magnetica nucleare sono stati eseguiti con uno spettrofotometro Bruker operante a 400 MHz in  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ . I chemical shift  $\delta$  sono espressi in ppm (scala  $\delta$ ).

Le analisi elementari sono state eseguite nel nostro laboratorio di analitica: la differenza tra i valori teorici e quelli calcolati è risultata essere compresa nell'intervallo di  $\pm 0,4\%$ .

Le evaporazioni sono state eseguite sottovuoto in evaporatore rotante e le disidratazioni delle fasi organiche sono state eseguite usando  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

Le TLC analitiche sono state effettuate usando lastre Merck di gel di silice G60 contenente un indicatore fluorescente  $20 \times 20.2$  mm; le varie macchie sono state evidenziate da una lampada UV (256 nm).

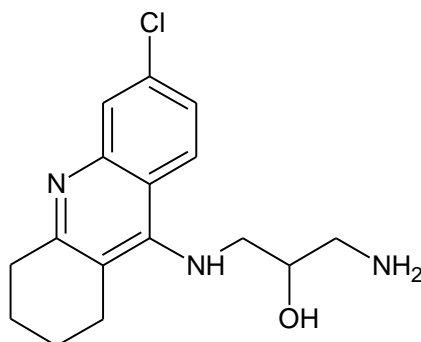
Per le cromatografie su colonna è stato usato un gel di silice Merck 70-230 Mesh.

**SCHEMA 1*****Sintesi di 6,9-dicloro-1,2,3,4-tetraidroacridina (6)***

Ad una miscela di acido-2-amino-4-clorobenzoico commerciale (2.00 g, 11.60 mmoli) e cicloesanone (1.14 g, 11.60 mmoli), raffreddata a 0°C, è stato aggiunto goccia a goccia POCl<sub>3</sub> (10 ml, 107 mmoli). La miscela di reazione così ottenuta è stata scaldata a riflusso per 2 h, quindi raffreddata a temperatura ambiente e concentrata sotto atmosfera di N<sub>2</sub>. Il residuo è stato ripreso con H<sub>2</sub>O e alcalinizzato fino a pH = 12 con una soluzione acquosa di KOH 1 N. La fase acquosa così ottenuta è stata estratta con AcOEt e la fase organica essiccata, filtrata e evaporata, per dare il prodotto desiderato **6**.

**Resa:** 94%

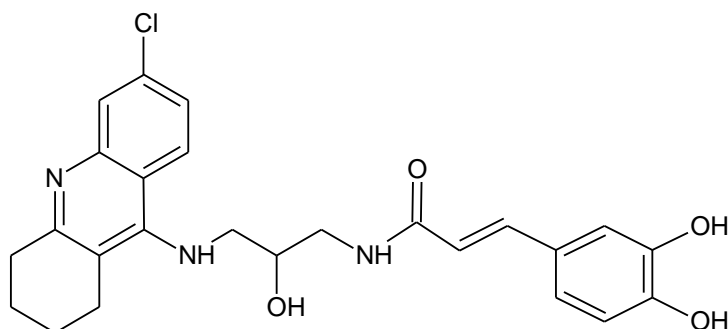
**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.94-1.95 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 2.98-3.01 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.10-3.12 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 7.48 (dd, 1H, *J* = 1.8, 9.2 Hz, Ar); 7.99 (d, 1H, *J* = 1.8 Hz, Ar); 8.09 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, Ar) ppm.

**SCHEMA 1*****Sintesi di 1-amino-3-[(6-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino]propan-2-olo (7)***

Una miscela del derivato **6** (1.00 g, 4.00 mmoli) e dell'1,3-diamino-2-propanolo commerciale (2.14 g, 23.80 mmoli) è stata mantenuta sotto agitazione alla temperatura di 160°C per 3 h. Trascorso tale periodo è stata aggiunta H<sub>2</sub>O (47 ml) fino alla formazione di una gomma, che è stata sciolta in AcOEt. La fase organica è stata essiccata, filtrata ed evaporata ottenendo un grezzo che è stato purificato tramite cromatografia su colonna, utilizzando come eluente una miscela di CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH 9:1 + 0.1 ml NH<sub>3</sub> acquosa al 30 % e fornendo il prodotto desiderato **7**.

**Resa:** 72 %

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>) δ: 1.90-1.92 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 2.64 (dd, 1H, J = 7.7, 12.7 Hz, CH<sub>2</sub>); 2.72-2.78 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2.89 (dd, 1H, J = 3.5, 12.7 Hz, CH<sub>2</sub>); 2.98-3.06 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.37 (dd, 1H J = 7.7, 12.7 Hz, CH<sub>2</sub>); 3.58 (dd, 1H, J = 3.5, 12.7 Hz, CH<sub>2</sub>); 3.67-3.73 (m, 1H, CHOH); 7.88-7.91 (m, 2H, Ar); 7.25-7.29 (m, 1H, Ar) ppm.

**SCHEMA 1*****Sintesi di (E)-N-(3-((6-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)-2-idrossipropil)-3-(3,4-diidrossifenil)acrilamide (1)***

Ad una soluzione di acido caffeico commerciale (68 mg, 0.38 mmoli) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 ml) e DMF (1.6 ml) sono stati aggiunti DCC (85 mg, 0.41 mmoli) e una punta di spatola di DMAP. La miscela di reazione così ottenuta è stata mantenuta sotto agitazione a temperatura ambiente per 1 h. Trascorso tale periodo è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione del derivato **7** (105 mg, 0.34 mmoli) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 ml) e DMF (0.5 ml). La miscela di reazione è stata lasciata a temperatura ambiente per 20 h, quindi il solvente è stato evaporato. Il grezzo così ottenuto è stato purificato tramite cromatografia flash utilizzando come eluente una miscela in gradiente di  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_3$  acquosa al 30 % (10:0:0.1 a 8:2:0.1) per fornire il prodotto desiderato **1**.

**Resa:** 25%

**P.f.** = 124-126°C

**<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD) δ: 1.89-1.94 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 2.77-2.82 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2.95-2.99 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.41 (d, 2H, *J* = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>); 3.51 (dd, 1H, *J* = 7.2, 13.2 Hz, CH<sub>2</sub>); 3.66 (dd, 1H, *J* = 4.8, 13.2 Hz, CH<sub>2</sub>); 3.87-3.90 (m, 1H, CHOH); 6.37 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, CH=); 6.76 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, Ar); 6.90 (dd, 1H, *J* = 2.0, 8.0 Hz, Ar); 7.00 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, Ar); 7.34 (dd, 1H, *J* = 2.0, 9.2 Hz, Ar); 7.38 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, CH=); 7.70 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, Ar); 8.17 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, Ar) ppm.

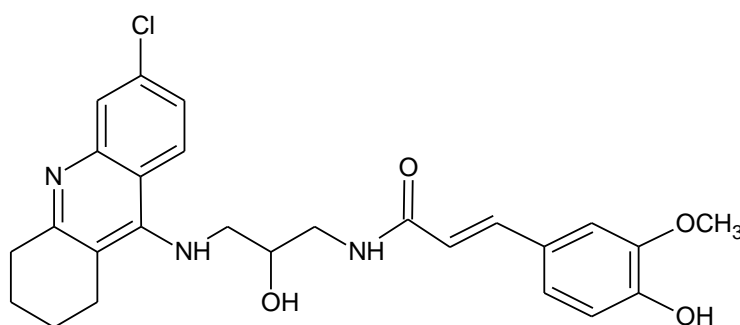
**<sup>13</sup>C NMR** (CD<sub>3</sub>OD) δ: 168.49, 158.79, 152.11, 147.72, 146.52, 145.46, 141.28, 134.37, 126.67, 125.19, 124.93, 123.98, 120.81, 118.08, 116.52, 115.96, 115.07, 113.63, 69.71, 51.10, 42.93, 32.65, 24.44, 22.47, 22.05 ppm.

**ANALISI ELEMENTARE:**

<b>C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b>	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>N</b>
<b>Calc.%</b>	64.17%	5.60%	8.98%
<b>Trov.%</b>	64.48%	5.81%	9.07%

**SCHEMA 1**

***Sintesi di (E)-N-(3-((6-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)-2-idrossipropil)-3-(4-idrossi-3-metossifenil)acrilamide (2)***



Ad una soluzione dell'acido ferulico **10** (150 mg, 0.77 mmoli) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 ml) DMF (1 ml) sono stati aggiunti DCC (174 mg, 0.84 mmoli) e una punta di spatola di DMAP e la soluzione risultante è stata posta sotto agitazione a temperatura ambiente per 1 h. Trascorso tale periodo è stata aggiunta goccia a goccia la soluzione del derivato **7** (215 mg, 0.70 mmoli) in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 ml) e DMF (1 ml). La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 20 h, quindi il solvente è stato evaporato. Il grezzo che è stato purificato tramite cromatografia flash utilizzando come eluente una miscela in gradiente di CHCl<sub>3</sub>/CH<sub>3</sub>OH/NH<sub>3</sub> acquosa al 30% (10:0:0.1 a 8:2:0.1) e successiva cristallizzazione da CHCl<sub>3</sub>, fornendo il composto desiderato **2**.

**Resa:** 31%

**P.f** = 220-222°C

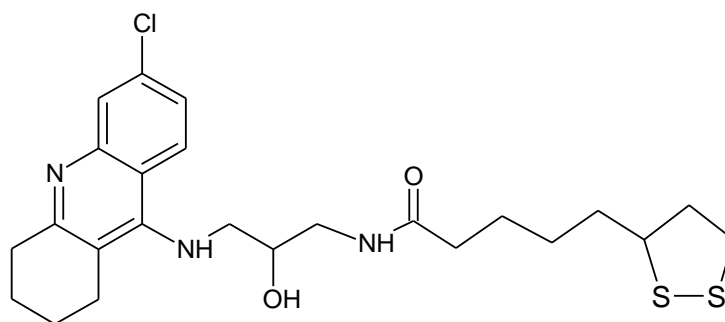


**$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 1.90-1.94 (m, 4H,  $\text{CH}_2$ ); 2.77-2.81 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 2.94-2.99 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ); 3.40 (d, 2H,  $J = 5.2$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 3.48 (dd, 1H,  $J = 7.2, 13.2$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 3.63 (dd, 1H,  $J = 4.4, 13.2$  Hz,  $\text{CH}_2$ ); 3.87 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.86-3.90 (m, 1H,  $\text{CHOH}$ ); 6.42 (d, 1H,  $J = 16$  Hz,  $\text{CH=}$ ); 6.78 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, Ar); 7.0 (d, 1H,  $J = 8.2$  Hz, Ar); 7.10 (s, 1H, Ar); 7.32 (dd, 1H,  $J = 1.8, 9.2$  Hz, Ar); 7.44 (d, 1H,  $J = 16$  Hz,  $\text{CH=}$ ); 7.72 (d, 1H,  $J = 1.8$  Hz, Ar); 8.14 (d, 1H,  $J = 9.2$  Hz, Ar) ppm.

**$^{13}\text{C}$  NMR** ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$ : 168.37, 159.14, 148.73, 147.95, 147.13, 141.12, 134.19, 127.11, 126.68, 125.24, 125.11, 123.92, 121.92, 117.90, 116.90, 116.13, 115.13, 110.20, 69.74, 54.98, 51.18, 42.93, 32.86, 24.48, 22.52, 22.13 ppm.

**ANALISI ELEMENTARE:**

<b><math>\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{ClN}_3\text{O}_4</math></b>	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>N</b>
<b>Calc.%</b>	64.79%	5.86%	8.72%
<b>Trov.%</b>	65.03%	6.02%	8.99%

**SCHEMA 1*****Sintesi di N-(3-((6-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)-2-idrossipropil)-5-(1,2-ditiolano-3-il)pentanamide (3)***

Ad una soluzione di acido lipoico commerciale (150 mg, 0.73 mmoli) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (minima quantità), posta sotto atmosfera di  $\text{N}_2$  e raffreddata a  $0^\circ\text{C}$ , è stato aggiunto  $\text{SOCl}_2$  (129 mg, 1.09 mmoli). La soluzione risultante è stata lasciata in agitazione a  $0^\circ\text{C}$ , per 4 h. Trascorso tale periodo il solvente è stato evaporato, sotto atmosfera di  $\text{N}_2$ . Il cloruro acido così ottenuto è stato aggiunto ad soluzione di **7** (185 mg, 0.61 mmoli) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4 ml) e DMF (1 ml), e  $\text{Et}_3\text{N}$  (61 mg, 0.61 mmoli) raffreddata a  $0^\circ\text{C}$ . La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione a  $0^\circ\text{C}$  per 4 h. Il solvente è stato quindi evaporato e il grezzo ottenuto è stato purificato tramite cromatografia flash utilizzando come eluente una miscela in gradiente di  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_3$  acquosa al 30% (10:0:0.1 a 8:2:0.1), per dare il derivato **3** desiderato.

**Resa:** 37%

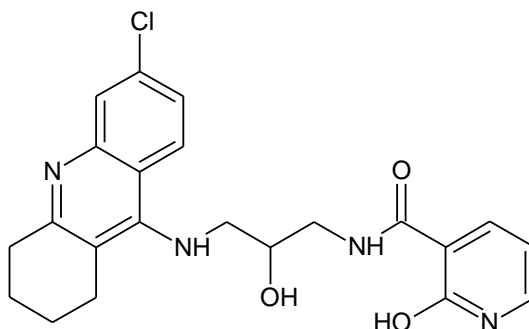
**P.f** =  $113\text{-}115^\circ\text{C}$

**<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD) δ: 1.36-1.42 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 1.55-1.65 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 1.80-1.85 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 1.91-1.93 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 2.19 (t, 2H, *J* = 7.4 Hz, Ar CH<sub>2</sub>); 2.37-2.42 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 2.78-2.80 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2.97-2.99 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.02-3.13 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.25-3.36 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.43- 3.48 (m, 2H, CH<sub>2</sub>, CH); 3.61 (dd, 1H, *J* = 4.6, 13.4 Hz, CH<sub>2</sub>); 3.80-3.83 (m, 1H, CHOH); 7.34 (dd, 1H, *J* = 2.2, 9.0 Hz, Ar); 7.75 (d, 1H, *J* = 2.2 Hz, Ar); 8.14 (d, 1H, *J* = 9.0 Hz, Ar) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (CD<sub>3</sub>OD) δ: 175.21, 159.04, 152.02, 147.08, 134.21, 125.21, 123.89, 118.19, 116.10, 69.64, 56.11, 51.26, 42.66, 39.88, 37.92, 35.38, 34.29, 32.84, 28.48, 25.31, 24.38, 22.51, 22.13 ppm.

**ANALISI ELEMENTARE:**

<b>C<sub>24</sub>H<sub>32</sub>CINOS</b>	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>N</b>	<b>S</b>
<b>Calc.%</b>	58.34%	6.53%	8.50%	12.98%
<b>Trov.%</b>	58.66%	6.72%	8.66%	13.22%

**SCHEMA 1*****Sintesi di N-(3-((6-cloro-1,2,3,4-tetraidroacridin-9-il)amino)-2-idrossipropil)-2-idrossinicotinamide (4)***

Ad una soluzione di acido 2-idrossinicotinico commerciale (97 mg, 0.70 mmoli) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 ml) e DMF (2.5 ml) sono stati aggiunti DCC (157 mg, 0.76 mmoli) e una punta di spatola di DMAP. La soluzione così ottenuta è stata posta sotto agitazione a temperatura ambiente per 1 h. Trascorso tale periodo è stata aggiunta goccia a goccia la soluzione del derivato **7** (194 mg, 0.64 mmoli) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (4 ml) e DMF (1 ml). La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione, a temperatura ambiente per 48 h. Il solvente è stato quindi evaporato ottenendo un grezzo che è stato purificato tramite cromatografia flash utilizzando come eluente una miscela in gradiente di  $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}/\text{NH}_3$  acquosa al 30% (10:0:0.1 a 9.6:0.4:0.1).

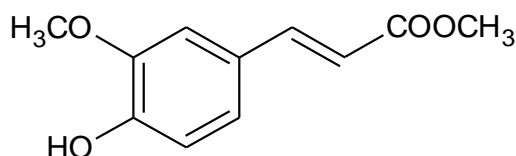
**Resa:** 22%

**<sup>1</sup>H NMR** (CD<sub>3</sub>OD) δ: 1.90-1.94 (m, 4H, CH<sub>2</sub>); 2.78-2.82 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 2.97-3.0 (m, 2H, CH<sub>2</sub>); 3.54 (d, 2H, *J* = 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>); 3.54-3.58 (m, 1H, CH<sub>2</sub>); 3.68 (dd, 1H, *J* = 4.8, 13.2 Hz, CH<sub>2</sub>); 3.95-3.97 (m, 1H, CHOH); 6.56 (dd, 1H, *J* = 6.6, 7.6 Hz, Ar); 7.31 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, Ar); 7.68 (d, 1H, *J* = 6.6 Hz, Ar); 7.73 (s, 1H, Ar); 8.14 (d, 1H, *J* = 9.2 Hz, Ar); 8.43 (d, 1H, *J* = 7.6 Hz, Ar) ppm.

**<sup>13</sup>C NMR** (CD<sub>3</sub>OD) δ: 174.38, 165.15, 162.77, 158.99, 152.00, 146.94, 144.59, 138.94, 134.20, 125.15, 123.91, 120.05, 118.18, 116.14, 106.81, 69.42, 51.11, 42.59, 32.76, 24.45, 22.49, 22.08 ppm.

**ANALISI ELEMENTARE:**

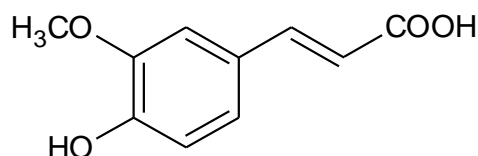
<b>C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>CIN<sub>4</sub>O<sub>3</sub></b>	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>N</b>
<b>Calc.%</b>	61.90%	5.43%	13.12%
<b>Trov.%</b>	62.09%	5.66%	13.34%

**SCHEMA 2*****Sintesi dell'estere metilico dell'acido ferulico (9)***

Ad una soluzione di metossicarbonilmetilen-trifenilfosforano (2.17 g, 6.50 mmoli) in  $\text{CHCN}_3$  (12 ml) sono stati aggiunti la vanillina (1.00 g, 6.50 mmoli) e la DBU (1 ml, 6.69 mmoli) e la miscela risultante è stata scaldata a riflusso per 24 h. Trascorso tale periodo la miscela di reazione è stata raffreddata e il solvente evaporato. Il grezzo così ottenendo è stato purificato tramite cromatografia su colonna, utilizzando come eluente una miscela AcOEt/esano in rapporto 7:3, fornendo l'estere **9**.

**Resa:** 42%

**$^1\text{H}$  NMR** ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 3.78 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 3.90 (s, 3H,  $\text{OCH}_3$ ); 6.28 (d, 1H,  $J$  = 15.8 Hz,  $\text{CH=}$ ); 6.90 (d, 1H,  $J$  = 8.4 Hz, Ar); 7.00 (d, 1H,  $J$  = 1.6 Hz, Ar); 7.07 (dd, 1H,  $J$  = 1.6, 8.4 Hz, Ar); 7.61 (d, 1H,  $J$  = 15.8 Hz,  $\text{CH=}$ ) ppm.

**SCHEMA 2*****Sintesi dell'acido ferulico (10)***

Alla soluzione dell'estere **9** (568 mg, 2.73 mmoli) in CH<sub>3</sub>OH, è stato aggiunto NaOH acquoso al 10 % (0.46 ml. La soluzione risultante è stata lasciata in agitazione a riflusso per 1 h. Trascorso tale periodo il solvente è stato evaporato ed il residuo è stato ripreso con H<sub>2</sub>O, acidificato con HCl 1 N fino a pH = 5 ed estratto con AcOEt. La fase organica è stata essicata, filtrata ed evaporata fornendo il prodotto desiderato **10**.

**Resa:** 78%

**<sup>1</sup>H NMR** (CDCl<sub>3</sub>) δ: 3.94 (s, 3H, OCH<sub>3</sub>); 6.30 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, CH=); 6.94 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, Ar); 7.06 (d, 1H, *J* = 1.4 Hz, Ar); 7.12 (dd, 1H, *J* = 1.4, 8.0 Hz, Ar); 7.71 (d, 1H, *J* = 15.6 Hz, CH=) ppm.



# **Bibliografia**



- [1] S. L. Wagner, R. E. Tanzi, W. C. Mobley, D. Galasko, *Potential Use of  $\gamma$ -Secretase Modulators in the Treatment of AD*, Arch Neurol, Vol. 69 (No.10), Oct. 2012
- [2] Jin-Taiyo, Lan Tan and John Hardy, *Apolipoprotein E in Alzheimer's disease: an update*, Annual Review of Neuroscience, Vol. 37, 2014
- [3] P. J. Crouch, A. R. White, A. I. Bush, *Metals and Alzheimer's Disease*, Febs J. 2007, 274; 3775-83
- [4] K. Blennow, M. J. De Leon, H. Zetterberg, *Alzheimer's Disease*, Lancet 2006, 368; 387-403
- [5] Smart TG et al., *Zn<sup>2+</sup> ions: modulators of excitatory and inhibitory synaptic activity*, Neuroscientist 2004, 10; 432-442
- [6] Schlieff et al., *Copper homeostasis in the CNS: a novel link between the NMDA receptor and copper homeostasis in the hippocampus*, Mol Neurobiol 2006, 33; 81-90
- [7] Marx J., *Alzheimer's disease Fresh evidence points to an old suspect: calcium*, Science 2007, 318; 384–385
- [8] Green KN, LaFerla FM., *Linking calcium to Abeta and Alzheimer's disease*, Neuron 2008, 59; 190–194
- [9] Franziska Hoffgaard, *Structure-based, biophysical annotation of molecular coevolution of acetylcholinesterase*, Proteins 2011, 79; 3144-54

- [10] Rosini, M., Andrisano, V., Bartolini, M., Bolognesi, M. L., Hrelia, P., Minarini, A., Tarozzi, A., Melchiorre, C. *Rational approach to discover multipotent anti-Alzheimer drugs*, J. Med. Chem. 2005, 48; 360–363
- [11] Pi, R., Mao, X., Chao, X., Cheng, Z., Liu, M., Duan, X., Ye, M., Chen, X., Mei, Z., Liu, P., Li, W., Han, Y, *Tacrine-6-ferulic acid, a novel multifunctional dimer, inhibits amyloid-beta-mediated Alzheimer's disease-associated pathogenesis in vitro and in vivo*, PLoS One 2012, 7, e31921
- [12] Rodriguez-Franco MI, Fernandez-Bachiller MI, Perez C, Hernandez-Ledesma B, Bartolome B., *Novel tacrine-melatonin hybrids as dual-acting drugs for Alzheimer disease, with improved acetylcholinesterase inhibitory and antioxidant properties*, J Med Chem 2006, 49; 459–462
- [13] V. Capurro, P. Busquet, J. P. Lopes et al., *Pharmacological characterization of memoquin, a multi-target compound for the treatment of Alzheimer's disease*, PLoS One, Vol. 8, 2013, no. 2, p.e56870
- [14] Marco-Contelles J, Leon R, de los Rios C, Samadi A, Bartolini M, Andrisano V, Huertas O, Barril X, Luque FJ, Rodriguez-Franco MI, Lopez B, Lopez MG, Garcia AG, Carreiras Mdo C, Villarroja M., *Tacripyrines, the first tacrine-dihydropyridine hybrids, as multitarget-directed ligands for the treatment of Alzheimer's disease*, J Med Chem 2009, 52; 2724–2732
- [15] Schugar H, Green DE, Bowen ML, Scott LE, Storr T, Bohmerle K, Thomas F, Allen DD, Lockman PR, Merkel M, Thompson KH, Orvig C., *Combating Alzheimer's disease with multifunctional molecules designed for metal passivation*, Angew Chem Int Ed Engl 2007, 46; 1716–1718

- [16] M.I.Fernandez-Bachiller et al. *Novel tacrine-8-hydroxyquinoline hybrids as multifunctional agents for the treatment of Alzheimer's disease, with neuroprotective, cholinergic, antioxidant, and copper-complexing properties*, Med. Chem. 2010, 53; 4927-37
- [17] H.Zheng, M.B.H. Youdim, M. Fridkin, *Site-activated chelators targeting acetylcholinesterase and monoamine oxidase for Alzheimer's therapy*, ACS Chem. Biol, 5 2010, 603-10
- [18] Markesbery W. R., *Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease*, Free Radical Biology & Medicine 1997, 23, 134-147
- [19] Mecocci, P., Polidori, M. C., *Antioxidant clinical trials in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease*, Biochim. Biophys. Acta 2012, 1822; 631–638
- [20] Wen-Yong Huang, Xiao-Juan Chao, Ying Ouyang, An-Min Liu, Xi-Xin He, Mei-Hui Chen, Lan-Hua Wang, Jun Liu, Si-Wang Yu, S. Rapposelli & Rong-Biao Pi, *Tacrine-6-Ferulic Acid, a Novel Multifunctional Dimer Against Alzheimer's Disease, Prevents Oxidative Stress-Induced Neuronal Death Through Activating Nrf2/ARE/HO-1 Pathway in HT22 Cells*, CNS Neuroscience & Therapeutics 18 2012, 950–952
- [21] Joshi G, Johnson JA. *The Nrf2-ARE pathway: a valuable therapeutic target for the treatment of neurodegenerative diseases*. Recent Pat CNS Drug Discov 2012, [Epub ahead of print]
- [22] Xiaojuan Chao, Xixin He, Yilin Yang, Xie Zhou, Minghua Jin, Shu Liu, Zhiyi Cheng, Peiqing Liu, Yuting Wang, Jianchen Yu, Yi Tan, Yingjuan Huang, Jian Qin, S.Rapposelli, Rongbiao Pi, *Design, synthesis and pharmacological evaluation of novel tacrine–caffeic*

*acid hybrids as multi-targeted compounds against Alzheimer's disease*,  
Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 22 2012, 6498–6502

[23] Sija, É., Nagy, N.V., Gandin, V., Marzano, C., Jakusch, T., Dean, A., Di Marco, V.B., Kiss, T, *Hydroxypyridinecarboxylic acid derivatives influencing metal ion levels in the brain: Equilibrium complexation studies with Cu(II) and Zn(II)*, Polyhedron Volume 67 2014, 481-489